PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG PERIPLASMATISCHER MEMBRANOLIGOSACCHARIDE ("MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES"/MDO) BEI ESCHERICHIA COLI K 12: UNTERSUCHUNGEN AN MUTANTEN DER MDO-BIOSYNTHESE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
WALTRAUD ANNELIESE FIEDLER
aus Stuttgart

1987

PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG PERIPLASMATISCHER MEMBRANOLIGOSACCHARIDE ("MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES"/MDO) BEI ESCHERICHIA COLI K 12: UNTERSUCHUNGEN AN MUTANTEN DER MDO-BIOSYNTHESE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
WALTRAUD ANNELIESE FIEDLER
aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	30. September 1987
Dekan:	Professor Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Hantke

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Lehrstuhl Mikrobiologie II des Institutes für Biologie II der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit sowie für seine ständige, freundliche Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. Rotering danke ich für sein ständiges Interesse, für viele wichtige Anregungen und praktische Hilfen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K. Hantke danke ich für viele interessante Diskussionen und Anregungen.

Bei Burkard Neuß möchte ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und die Bedienung des Aminosäureanalysators bedanken.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 12

2.1. Chemikalien 12

2.2. Nährmedien 14

2.3. Bakterienstämme und Bakteriophagen 16

2.4. Kulturbedingungen 19

2.5. Genetische Methoden 19

2.5.1. P1-Transduktion 19
2.5.2. Tests der Transduktanten 20
2.5.3. Isolierung von Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp 20

2.6. MDO-Analyse 21

2.6.1. MDO-Extraktion 21
2.6.2. Biogel P6-Säulenchromatographie 21
2.6.3. MDO-Zuckerbestimmung 22
2.6.4. Anthron-Test 23
2.6.5. Quantitative Bestimmung der MDO-Substituenten 23
2.6.5.1. Nachweisreaktionen zur Bestimmung von Glycerin-1-Phosphat, Succinat und Phosphoethanolamin 23
2.6.5.2. Übersicht über den Analysengang ... 25
2.6.5.3. Glycerin-Nachweis 26
2.6.5.4. Succinat-Nachweis 26
2.6.5.5. Ethanolamin-Nachweis 27

2.7. Lipid-Analyse 28

2.7.1. Lipid-Extraktion nach Bligh-Dyer 28
2.7.2. Chromatographie der neutralen Lipide. 28
2.7.3. Radioaktivitätsmessung der einzelnen Lipidbanden 29

2.8. In vivo Nachweis der Phosphoglycerin-Transferase I-Aktivität 30

2.8.1. Isolierung von Arbutin-Phosphoglycerin 30

2.8.2. Chemische Identifizierung von Arbutin-Phosphoglycerin 31
2.8.3. Dünnschichtchromatographie von Arbutin-Phosphoglycerin 32

2.9. Qualitative Bestimmung des Poringehalts der äußeren Membran 33

2.9.1. Isolierung äußerer Membranen 33
2.9.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .. 33

2.10. Flagellenisolierung 34

2.11. Chemotaxistest auf Trypton-Schwärm-platten 35

2.12. Test auf Schleimbildung 35

2.13. Test auf Sensitivität gegenüber Bacitracin 36

2.14. Phagentests 36

2.14.1. Test auf Sensitivität gegenüber χ-Phagen 36
2.14.2. Test auf Sensitivität gegenüber Tu1a- und TU1b-Phagen 37
2.14.3. Test auf Sensitivität gegnüber TUC-Phagen 37
2.14.4. Sonstige Phagentests 37

3. Ergebnisse 39

3.1. Stammkonstruktionen 39

3.1.1. Transduktion einer definierten *mdoA* Mutation aus dem Stamm T10GP in den chemotaxispositiven Stamm MA1008 39
3.1.2. Konstruktion einer *mdoA*, *pyrC* Doppel-mutante 40
3.1.3. Übertragung der *mdoA* Mutation in den Stamm RZ600 42

3.2. Phänotypische Charakterisierung einer *mdoA* Mutante 43

3.2.1. Charakterisierung des Chemotaxis-phänotyps 43
3.2.1.1. Chemotaxistest auf Trypton-Schwärm-platten 43
3.2.1.2. Sensitivität gegenüber χ-Phagen ... 44
3.2.1.3. Nachweis der Flagellen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 45

3.2.2. Expression der Porine 46
3.2.3. Schleimbildung 48
3.2.4. Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin 50
3.2.5. Wachstum unter osmotischem Steß 51
3.2.6. Sensitivität gegenüber Phagen 51

3.3. Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp 52

3.3.1. Isolierung von Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp 52
3.3.2. MDO-Gehalt der Phänotyp-Revertanten . 52
3.3.3. Phänotypische Eigenschaften der Revertanten 54
3.3.4. Kartierung der Revertanten 58
3.3.4.1. Revertante TA1008/0 58
3.3.4.2. Suppressormutanten TA1008/1-TA1008/7 58
3.3.4.3. Suppressormutanten TA1009/1-TA1009/11 64
3.3.4.4. Einführung der *ompR2* Mutation in die *mdoA* Mutante TA1008 67

3.4. Isolierung einer *mdoB* Mutante 68

3.5. Kartierung der *mdoB*::Tn*10* Mutation 68

3.6. Biochemische Charakterisierung einer *mdoB* Mutante 71

3.6.1. Vorraussetzungen für den *in vivo*-Test der Phosphoglycerin-Transferase I-Aktivität 71
3.6.2. Nachweis der Phosphoglycerin-übertragung auf Arbutin *in vivo* 73
3.6.3. Chemische Identifizierung von Arbutinphosphoglycerin 74
3.6.4. Akkumulation von Diglycerid in *dgk mdoB* Doppelmutanten 78

3.7. Bestimmung der MDO-Substituenten 81

3.8. Phänotypische Eigenschaften einer *mdoB* Mutante 83

4. Diskussion 86

4.1. *mdoA* Phänotyp und chemotaxispositive Revertanten 86

4.2. Nachweis der *mdoB* Mutation und *mdoB* Phänotyp 98

4.3. Grundsätzliche Überlegungen zur Funktion von MDO 102

5. Zusammenfassung 104

Literaturverzeichnis 106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACP	Acylcarrier-Protein
ATP/ADP	Adenosin 5`-tri(di)phosphat
Bq	Bequerel
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
deion.	deionisiert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECA	Enterobacterial Commom Antigen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
g	Erdbeschleunigung
GTP/GDP	Guanosin 5-`tri(di)phosphat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Methyl-accepting Chemotaxis-Protein
MDO	Membrane-Derived Oligosaccharides
Min./min.	Minuten/minütig
NADH	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
OD	optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pi	anorganisches Phosphat
RNA/m-RNA	(messenger)-Ribonucleinsäure
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std./std.	Stunde(n)/stündig
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat

1. Einleitung

Escherichia coli

Escherichia coli ist ein typisches gramnegatives Bakterium, das in der Regel als harmloser Kommensale den Darm besiedelt. Es gibt jedoch auch *Escherichia coli* Stämme, die pathogen sind. In mikrobiologischen Labors wird vor allem mit dem Stamm *E.coli K12* gearbeitet, der vor ca. 60 Jahren isoliert wurde und seitdem nur im Labor gezüchtet wird. Daher hat dieser Stamm viele Eigenschaften, die für das Überleben im natürlichen Habitat notwendig sind, verloren. Trotz dieser Einschränkung war und ist *E.coli K12* der Modellorganismus zur Untersuchung grundlegender molekularbiologischer Fragestellungen.

Die Zellhülle von *E.coli K12*

Die in dieser Arbeit auf ihre Funktion untersuchten "Membrane-Derived Oligosaccharides" (MDO) sind ein Bestandteil der Zellhülle von *E. coli* und anderen gramnegativen Bakterien (54, 78). Ihre Funktion muß im strukturellen und funktionalen Zusammenhang der gesamten Zellhülle betrachtet werden. Im folgenden soll daher eine Übersicht über den Aufbau der Zellhülle von *E. coli K12* gegeben werden.

Die Zellhülle von *E.coli K12* und anderen gramnegativen Bakterien weist die in Abb. 1 schematisch dargestellte komplexe Struktur auf. Sie besteht im Gegensatz zur Zellhülle grampositiver Bakterien aus zwei Membranen, die sich hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Funktion unterscheiden. Die Zelle erhält dadurch ein zweites Zellkompartiment das sogenannte Periplasma.

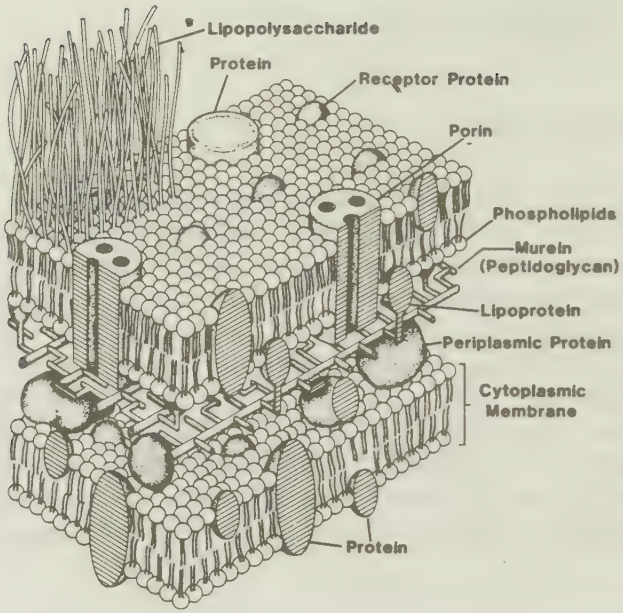


Abb. 1 (14)

Schematische Darstellung der Zellhülle von *E. coli K12*

Die Cytoplasmamembran besteht aus einer symmetrisch aufgebauten Phospholipiddoppelschicht, in die eine Vielzahl von Proteinen integriert ist. Sie weist die Eigenschaften einer semipermeablen Membran auf und stellt somit die eigentliche Permeabilitätsbarriere der Zelle dar. Der Stofftransport durch die Cytoplasmamembran benötigt daher aktive Transportsysteme, die unter Energieverbrauch arbeiten. Neben diesen Transportsystemen enthält die Cytoplasmamembran die Enzyme der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung sowie Biosyntheseenzyme für Membrankomponenten.

Der bei gramnegativen Bakterien wahrscheinlich 3-schichtige Mureinsacculus (28) liegt im Periplasma unmittelbar unter der äußeren Membran und ist über Lipo-

proteinmoleküle in ihr verankert (12, 13). Er ist für die äußere Gestalt der Zelle verantwortlich und verleiht ihr ihre mechanische Stabilität.

Die äußere Membran kann als eine Art Molekularsieb mit hydrophiler Oberfläche betrachtet werden, d.h. sie ist für kleine, hydrophile Substanzen durchlässig. Große Moleküle oder lipophile Substanzen können die Membran nicht passieren. Die äußere Membran stellt daher keine echte osmotische Barriere dar.

In alle Schichten der Zellhülle eingebettet sind die für die Motilität der Bakterien verantwortlichen Flagellen (18, 19, 20). Sie bestehen aus drei Strukturelementen: dem Filament, dem nahe der Zelloberfläche liegenden Haken und dem in der Zellhülle liegenden Basalkörper. Er besteht aus einem zentralen Stift, der bei gramnegativen Bakterien zwei Paare von Ringen trägt. Das äußere Ringpaar (L-und P-Ring) ist mit der äußeren Membran und dem Mureinsacculus, das innere Ringpaar (S- und M-Ring) mit der Cytoplasmamembran assoziiert (19).

Die äußere Membran

Die äußere Membran ist das für gramnegative Bakterien charakteristische Element der Zellhülle. Sie unterscheidet sich hinsichtlich Struktur und Funktion deutlich von der Cytoplasmamembran.

An der Außenseite der äußeren Membran sind die Phospholipide durch den Lipid-A-Teil des LPS ersetzt. Die stark hydrophilen Polysaccharidketten des LPS sind nach außen gerichtet und bestimmen die Antigenität, aber auch die Permeabilität der Zellhülle. Lipophile Substanzen können diese hydrophile Polysaccharidschicht nur schwer durchdringen. Der Proteingehalt der äußeren Membran ist weniger vielfältig als der der Cytoplasmamembran. Es überwiegen wenige Hauptproteine, die mit ca. 10^5 Kopien pro Zelle vorkommen.

Zu diesen Hauptproteinen gehören die Porine OmpF und OmpC, die als Trimere Poren für niedermolekulare Substanzen bilden (74, 75). Das Ausschlußvolumen dieser Poren beträgt 600 Dalton. Die OmpF-Pore weist jedoch einen geringfügig größeren Porendurchmesser auf als die OmpC-Pore (61). Die Durchlässigkeit dieser Poren wird jedoch nicht nur vom Porendurchmesser sondern auch vom sauren Charakter der Porine bestimmt. Kationische und neutrale Moleküle können die Poren daher besser passieren als Anionen (60). Die Synthese der Porine wird über das *ompB* Operon in Abhängigkeit von der Osmolarität der Zellumgebung gesteuert, d.h. bei niedriger Osmolarität wird bevorzugt OmpF, bei hoher Osmolarität bevorzugt OmpC synthetisiert (91).

Neben den Porinen zählen das OmpA-Protein und das Lipoprotein zu den Hauptproteinen der äußeren Membran. Das OmpA-Protein stellt den Rezeptor für einige Phagen und Colicine dar. Es ist bei Konjugationen an der Ausbildung stabiler Zellkontakte beteiligt (81). Das Lipoprotein ist das häufigste Protein der äußeren Membran. Es kommt mit ca. $7{,}5\times10^5$ Kopien pro Zelle vor und liegt zu ca. 1/3 in mureingebundener Form vor. Es ist verantwortlich für die Verankerung der äußeren Membran am Mureinsacculus (12, 13).

Außer den Hauptproteinen gibt es in der äußeren Membran noch ca. 50 seltenere Proteine. Ihre Synthese wird meist nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen induziert, so daß sie dann in etwa gleicher Menge vorliegen können wie die Hauptproteine. Diese Proteine dienen als spezifische Poren oder Rezeptoren für Substrate, die zu groß sind, um die Poren der äußeren Membran zu passieren. Sie können jedoch auch von Phagen und Colicinen als Rezeptoren benutzt werden.

Das Periplasma

Äußere Membran und Cytoplasmamembran teilen die Zelle in 2 Kompartimente: Cytoplasma und Periplasma.

Im Periplasma findet man lösliche Proteine und Zucker. Bei den Proteinen unterscheidet man katabole Enzyme (z.B. alkalische Phosphatase), Abbauenzyme für Zellgifte (z.B. β-Lactamase) und Bindeproteine einiger Transportsysteme (z.B. Maltose-Bindeprotein). Bei den Zuckern handelt es sich in erster Linie um die sogenannten Membrane-Derived Oligosaccarides (MDO).

Über das Volumen des Periplasmas im Verhältnis zum Gesamtzellvolumen gibt es unterschiedliche Angaben.

Stock, Rauch und Roseman (84) beschreiben die Wirkung der Osmolarität des Außenmediums auf die Volumina der beiden Zellkompartimente. Die Autoren geben an, daß das Periplasmavolumen von *S. typhimurium* nach Anzucht in Minimalmedium 20% - 40% des gesamten Zellvolumens ausmacht. Nach Zusatz von 1M Saccharose zum Medium plasmolysieren die Zellen, das Volumen des Periplasmas steigt auf Kosten des Cytoplasmavolumens auf 80% an. Wird die Osmolarität des Mediums durch Substanzen erhöht, die die äußere Membran nicht passieren können, so schrumpfen die ganzen Zellen auf ca. 60% ihres Ausgangsvolumens. Das Verhältnis des Periplasma zum Cytoplasma bleibt dabei gleich. Dies bedeutet, daß der Wasserverlust aus beiden Zellkompartimenten gleich groß sein muß. Die Autoren leiten hieraus die Forderung ab, daß Periplasma und Cytoplasma isoosmolar sind. Weiterhin finden die Autoren durch den Einsatz radioaktiver Ionen eine ungleiche Verteilung von Na^+ und Cl^--Ionen in Periplasma und Außenmedium, wobei im Periplasma Na^+-Ionen und im Medium Cl^--Ionen überwiegen. Daraus resultiert eine Potentialdifferenz, das sogenannte Donnan-Potential, das nach Berechnungen der Autoren je nach Ionenstärke des umgebenden Mediums 5-80 mV betragen kann.

Auf Grund ihrer Meßergebnisse fordern die Autoren, daß

im Periplasma Polyanionen fixiert sein müssen (84), die ihrerseits positive Gegenionen binden. Sie stellen jedoch keinen Zusammenhang zu den schon 1973 von van Golde, Schulman und Kennedy (92) beschriebenen MDO her.

Im Gegensatz zu den hohen Volumenangaben von Stock et al. stehen die Angaben von Nikaido, der für normale, nicht plasmolysierte Zellen (*S. typhimurium, E. coli*) 5%, für gehungerte oder stationäre Zellen 13% Periplasmavolumen angibt (60).

Über die strukturelle Organisation des Periplasmas gibt es ebenfalls unterschiedliche Vorstellungen.

Ältere elektronenmikroskopische Darstellungen (41) führten zu der Annahme, daß das Periplasma ein Hohlraum ist, in dem Proteine und andere Moleküle frei diffundieren können.

Neuere Untersuchungen gehen dagegen davon aus, daß das Periplasma kein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum ist. Hobot et al. (35) fanden 1984 mit Hilfe einer neuen Einbettungsmethode für elektronenmikroskopische Präparate, daß die Zellhülle von *E.coli B* ein einheitliches Erscheinungsbild aufweist und kein periplasmatischer Hohlraum zu erkennen ist. Sie postulieren daher, daß das gesamte Periplasma von stark hydratisiertem Murein angefüllt ist, dessen Vernetzungsgrad von außen nach innen deutlich abnimmt, so daß innen frei bewegliche Polysaccharidketten vorliegen, die ein stark visköses Gel bilden. Das Periplasma stellt demnach nach Ansicht der Autoren ein Polysaccharidgerüst dar, das von einer wässrigen Lösung an Proteinen und Zuckern umgeben ist.

Brass et al. (11) kamen 1986 auf Grund von Messungen der lateralen Beweglichkeit von Proteinen im Periplasma zu dem Schluß, daß das Periplasma nicht nur ein stark visköses Gel sein kann, sondern eine noch dichtere Konsistenz aufweisen muß. Diese wird ihrer Meinung nach durch einen sehr hohen Proteingehalt hervorgerufen, der das Vorhandensein von freiem Wasser unwahrscheinlich macht und somit die Beweglichkeit der Proteine selbst

als auch die Diffusion kleiner Moleküle einschränkt.

"Membrane Derived Oligosaccharides"

MDO-Moleküle bestehen aus ca. 10 Glucoseeinheiten, die über β 1-2 und β 1-6 glycosidische Bindungen verknüpft sind. Die einzelnen MDO-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 2200 - 2600 Dalton sind stark verzweigt (76). An freien C-6-Atomen der Glucose kann Glycerin-1-Phosphat oder Phosphoethanolamin als Phosphodiester gebunden sein. Daneben kommt auch Succinat in Esterbindung vor (42). Auf Grund dieser Liganden trägt jedes MDO-Molekül mehrere negative Ladungen (43).

Entdeckt wurden MDO 1973 von van Golde, Schulman und Kennedy (92). Sie fanden, daß der Umsatz der Membranphospholipide mit der Biosynthese glycerinphosphathaltiger Oligosaccharide gekoppelt ist (92, 77), die im Periplasma gramnegativer Bakterien vorkommen (54, 78). Im gleichen Jahr berichteten Munro und Bell (58), daß der Umsatz der Membranphospholipide in *E.coli B* abnimmt, wenn die Osmolarität des Außenmediums der Zelle erhöht wird. Sie brachten diesen osmolaritätsabhängigen Prozeß jedoch nicht mit den unmittelbar zuvor beschriebenen MDO in Verbindung.

Der Zusammenhang zwischen dieser osmolaritätsabhängigen Phospholipidumsetzung einerseits und der mit dem Phospholipidstoffwechsel gekoppelten MDO-Synthese andererseits wurde erst offensichtlich, als Kennedy 1981 die Abhängigkeit des MDO-Gehalts der Zelle von der Osmolarität des umgebenden Mediums entdeckte (43). Er fand in Zellen, die in Medium niedriger Osmolarität wachsen, 16 mal mehr MDO als bei Wachstum in hochosmolarem Medium (Zusatz von 0,4M NaCl). Kennedy brachte dieses Ergebnis auch mit der Arbeit von Stock, Rauch und Roseman (84) in Verbindung und postulierte, daß es sich bei den von diesen Autoren geforderten Polyanionen um

MDO handeln müßte.

Die negativ geladenen MDO-Moleküle und deren positive Gegenionen sollten in Medium niedriger Osmolarität für die Angleichung der periplasmatischen Osmolarität an die des Cytoplasmas verantwortlich sein. Gäbe es diese Angleichung nicht, so entstünde durch die unterschiedlichen Osmolaritäten in Periplasma (50mosM) und Cytoplasma (300mosM) ein auf die Cytoplasmamembran wirkender Turgordruck von 6,4 atm. (43).

Kennedy stellt daher folgendes Modell für die Regulation der MDO-Synthese vor: Wenn die Osmolarität des Periplasmas unter die des Cytoplasmas fällt, so wird der auf die Cytoplasmamembran wirkende Turgordruck von einem Osmosensor registriert, der daraufhin ein Signal erzeugt, das die Expression der für die MDO-Synthese nötigen Proteine erhöht. Neusynthese von Proteinen ist für diese osmotische Anpassung nötig, da die Zugabe von Chloramphenicol die Stimulierung der MDO-Synthese verhindert (43). Ist die MDO-Synthese maximal aktiviert, so hält sie auch nach dem Wechsel in hochosmolares Medium an. Die spezifische Aktivität der Biosyntheseenzyme wird jedoch durch den während des Zellwachstums eintretenden Verdünnungseffekt reduziert (43).

Dieses Modell für die Regulation der MDO-Synthese weist eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von Laimins, Rhoads und Epstein vorgestellten Modell der Regulation des *kdp* Operons auf (48). In beiden Fällen soll die Genexpression durch die Einwirkung einer mechanischen Kraft stimuliert werden.

Der Biosyntheseweg von MDO ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Abb. 2 zeigt das von Goldberg, Rumley und Kennedy 1981 postulierte Schema des generellen Ablaufs der MDO-Synthese (29).

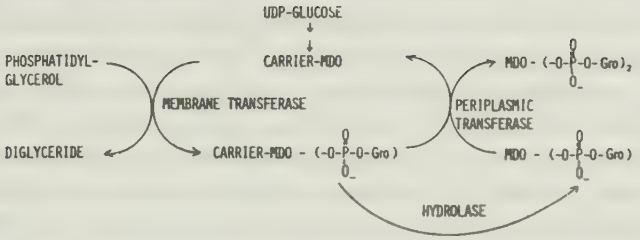


Abb. 2: Schema der MDO-Biosynthese

Für den Aufbau der MDO-Zuckerketten ist UDP-Glucose als Vorläufer notwendig. Die Kettenverlängerung wird durch ein Glucosyltransferase-Enzymsystem katalysiert, das *in vitro* folgende Komponenten benötigt (94):

- einen Primer (z.B. Octyl-β-D-Glucopyranosid)
- eine trypsinresistente Membranfraktion
- ein hitzestabiles Protein der löslichen Zellfraktion, genannt Transglucosylierungsfaktor
- UDP-Glucose
- Magnesiumionen

Das Produkt dieses 1984 von Weissborn und Kennedy etablierten *in vitro* Systems sind Glucoseoligomere, die nur β 1-2 Bindungen enthalten (94). Welches Enzym für die Ausbildung der β 1-6 Bindungen verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. Der Transglucosylierungsfaktor wurde 1986 von Therisod, Weissborn und Kennedy überraschenderweise als Acyl-Carrier-Protein (ACP) identifiziert (88). Diese Entdeckung war insofern völlig unerwartet als ACP nach bisheriger Kenntnis in *E.coli* für die Fettsäuresynthese oder die übertragung von Fettsäureresten auf Phospholipide und LPS nötig ist. Welche Funktion ACP bei der Transglucosylierungsreaktion hat, ist bisher unbekannt.

Wie Abb. 2 zeigt stammt der wichtigste Träger der ne-

gativen Ladungen von MDO, das Glycerin-1-Phosphat, aus dem Phospholipidstoffwechsel. Die Übertragung des Glycerin 1-Phosphats vom Phosphatidylglycerin auf membrangebundenes "Prä"-MDO (und synthetische β-Glucoside) wird durch die membrangebundene Phosphoglycerin-Transferase I katalysiert, die 1983 von Jackson und Kennedy (37) *in vitro* und 1984 von Bohin und Kennedy (10) *in vivo* nachgewiesen wurde. Bei dieser Transferreaktion entsteht "Prä"-MDO-1-Phosphoglycerin und Diglycerid, das normalerweise über die Diglycerid-Kinase-Reaktion als Phosphatidsäure wieder in den Phospholipidstoffwechsel eingeschleust wird (66). In Mutanten, denen die Diglycerid-Kinase fehlt, wird Diglycerid akkumuliert, wenn MDO produziert werden (68).

Eine zweite periplasmatische Phosphoglycerin-Transferase II überträgt die Glycerin-1-Phosphatreste von membrangebundenem MDO auf freies, periplasmatisches MDO, das zuvor durch eine Hydrolase vom Lipidcarrier freigesetzt worden ist. Diese Reaktion führt zu mehrfach substituierten MDO-Molekülen. Membrangebundenes MDO wird dadurch wieder frei, um neues Glycerin-1-Phosphat von Phosphatidylglycerin zu übernehmen. Diese periplasmatische Phosphoglycerin-Transferase II wurde 1981 von Goldberg, Rumley und Kennedy nachgewiesen (29).

Die Transferenzyme der Phosphoethanolamin- und Succinatübertragung auf MDO sind noch nicht beschrieben. 1987 wurde jedoch von Miller und Kennedy gezeigt, daß in Phospholipidvesikeln von außen zugegebenes Phosphatidylethanolamin von der Zelle als Phosphoethanolaminquelle für MDO genutzt werden kann (55). Das für diese Übertragung nötige Enzym scheint jedoch nicht mit der Phosphoglycerin-Transferase I identisch zu sein, da Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, den Phosphoethanolamintransfer noch ausführen können (55, 24).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion(en) von MDO mit Hilfe charakterisierter Mutanten der MDO-Biosynthese zu untersuchen. Da den negativen Ladungen von MDO eine wichtige Funktion zugewiesen wird (43, 54), sollte eine Mutante, die kein MDO besitzt (*mdoA*) hinsichtlich ihres Phänotyps mit einer Mutante verglichen werden, der die negativen Ladungen des Glycerin-1-Phosphats fehlen (*mdoB*), um so nicht nur über die Funktion von MDO als Ganzes, sondern auch über die Funktion der negativen Ladungen Aussagen machen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Amersham Buchler (Braunschweig)	1-^{14}C-Acetat 2-^{3}H-Glycerin
Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.)	Biogel-P2 Biogel-P6 Dowex AG WX-8 Ionenaustauscherharz
Boehringer (Mannheim)	Alkalische Phosphatase Glycerin-Kinase Lactat-Dehydrogenase Lysozym Pyruvat-Kinase Succinyl-CoA-Synthetase Adenosin 5`-Triphosphat Guanosin 5`-Triphosphat Coenzym A Nicotinsäureamidadenindinucleotid Phosphoenolpyruvat Desoxyribonuclease
Difco Laboratories (Detroit, Michigan)	Bacto-Agar Bacto-Pepton Bacto-Trypton Hefe-Extrakt Mac Conkey Agar-Base

Eastman Kodak Company (Rochester, USA)	Röntgenfilm XAR 5 Röntgenfilmentwickler LX 24 Röntgenfilmfixiersalz AL 4
Pharmacia (Freiburg)	Sephadex-G10
Serva Feinbiochemica (Heidelberg)	Acrylamid Methylenbisacrylamid Bromphenolblau Natriumdodecylsulfat Serva Blau G Triton-X-100 TMED Tetracyclin
Sigma Chemie (München)	Arbutin TRIZMA BASE
Whatman (Maidstone, Kent)	DEAE-Cellulose DE52
Zinsser-Analytic	Quickszint 402 Quickszint 501

Alle übrigen Chemikalien wurden analysenrein von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen.

2.2. Nährmedien

TY-Medium:

Bacto-Trypton	8	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	5	g/l

Pepton-Medium:

Bacto-Pepton	5	g/l
Thiaminiumdichlorid	20	mg/l

LOS-Medium (43):

KH_2PO_4	1	mM
$(NH_4)_2SO_4$	1,5	mM
$MgCl_2$	0,08	mM
$FeSO_4$	0,5	mg/l
Thiaminiumdichlorid	20	µg/ml
Casamino Säuren	5	g/l

M9-Medium:

KH_2PO_4	3	g/l
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	7,5	g/l
NH_4Cl	1	g/l
NaCl	0,5	g/l
$CaCl_2$	1	mM
$MgSO_4$	10	mM
Thiaminiumdichlorid	20	µg/ml
Glucose	4	g/l

Mac Conkey-Agar:

Mac Conkey-Agar-Base	40	g/l
C-Quelle	10	g/l

Vogel-Bonner Medium:

$Na(NH_4)HPO_4 \times 4H_2O$	3,5	g/l
K_2HPO_4	10	g/l
Citronensäure$\times H_2O$	2	g/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	g/l
Glucose	4	g/l

Trypton-Schwärmplatten:

Bacto-Trypton	10	g/l
NaCl	5	g/l
Bacto-Agar	3,5	g/l

Zum Grundmedium wurden für Plattenmedien 15g Bacto-Agar, für Weichagar 7,5g Bacto-Agar zugesetzt.

2.3. Bakterienstämme und Bakteriophagen

E. coli K12-

Stämme	genetische Eigenschaften	Herkunft
MA1008	*lacZ43, pyrC46, thi-1, relA1, spoT1*	a [2013]
TA1008	wie MA1008, aber *pyrC*$^+$ *mdoA1* von T10GP	diese Arbeit
TA2847	wie TA1008, aber *zhe5*::Tn*10*, *aroB* von WF2848	diese Arbeit
TA1007	wie TA1008, aber *zcd*::Tn*10*, *pyrC46* von R2041 bzw. MA1008	diese Arbeit
TA1009	wie TA1007, aber *pyrC46*, *zcd*::Tn*10* kuriert	diese Arbeit
TA1008/0	*mdoA*$^+$ Revertante von TA1008	diese Arbeit
TA1008/1	Suppressormutante abgeleitet von TA1008 mit chemotaxis-positivem und OmpC$^-$-Phänotyp	diese Arbeit
TA1008/2	wie TA1008/1	diese Arbeit
TA1008/3	wie TA1008/1	diese Arbeit
TA1008/4	wie TA1008/1	diese Arbeit
TA1008/6	wie TA1008/1	diese Arbeit
TA1008/7	wie TA1008/1	diese Arbeit
TA1009/1	Suppressormutante abgeleitet von TA1009 mit chemotaxispositivem Phänotyp, χ-resistent	diese Arbeit
TA1009/3	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/5	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/6	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/8	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/9	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/10	wie TA1009/1	diese Arbeit
TA1009/11	wie TA1009/1	diese Arbeit

E. coli K12-Stämme	genetische Eigenschaften	Herkunft
TA1009/1-1	wie TA1009/1, aber *pyrC*$^+$ von TA1008, außerdem phänotypisch χ-sensitiv, OmpC$^-$	diese Arbeit
T10GP	F-, *ilv*, *metE*, *lacI*, *mdoA1*, *rpsL*	a [2177] (9)
F10GP	wie T10GP, aber *mdoB*::Tn*10* von WF21-1	diese Arbeit (24)
WR1	*gpsA*, *glpD*, *glpR*, *glpK*, *phoA* *fadE*, *rel-1*, *fhuA*, λ-	a [649] (72)
WF21-1	wie WR1, aber *mdoB*::Tn*10*	diese Arbeit (72, 24)
KL16	Hfr, *thi-1*, *rel-1*, λ-	a [111]
WF16	wie KL16, aber *mdoB*::Tn*10* von WF21-1	diese Arbeit
RZ600	HfrH, *thi-1*, *relA1*	C.R.H. Raetz [902] (67)
WF600	wie RZ600, aber *mdoB*::Tn*10* WF21-1	diese Arbeit [2162]
RZ1009	wie RZ600, aber *zcd*::Tn*10* *mdoA1* von TA1007	diese Arbeit
RZ60	*dgk-6* Derivat von RZ600	C.R.H. Raetz [903] (67)
WF60	wie RZ60, aber *mdoB*::Tn*10* von WF21-1	diese Arbeit (24)
DF214	F-, *hisG1*, *rpsL115*, *pgi-7*::Mu1 Δ(*eda-zwf*)15	a [908] (93)
WF214	wie DF214, aber *mdoB*::Tn*10* von WF21-1	diese Arbeit (24)
AB1157	*thr*, *ara*, *leu*, *proA*, *lacY*, *gal* *his*, *arg*, *xyl*, *tsx*, *mtl*, *rpsL*	a [435]
JEF8	Hfr, *thr-31*, *carB-8*, *relA1*, *metB1*, λ-, *spoT1*	B. Bachmann (6)

E. coli K12-Stämme	genetische Eigenschaften	Herkunft
GM18	F-, *thr-1, ara-14, leuB5,* proA2, *lacY1, galK2, his-4, thyA12, rpsL31, xyl-5, metB1, thi-1, mtl, trmB1, tsx-33, deoB16, supE44*	a [722]
R2041	F-, *sus, zcd*::Tn*10*	a [2041]
AB2847	*aroB, malT, thi, tsx*	a [86]
WF2847	*aroB, thi, tsx, zhe4*::Tn*10*	a [1080]
WF2848	*aroB, thi, tsx, zhe5*::Tn*10*	a [1082]
KB5	F$^-$, *thr, leu, lacY, his, rpsl, xyl, thi,* Δ(*phoA phoE gpt*) *bgl phoS21, ompC*::Tn*5*	a [2196] J.M. Brass
FN103	F$^-$, *tsx, malA, supE, ompR119* (*ompR2*-Typ), λ$^-$, λ^r	a [2151] S. Mizushima

a: Stammsammlung am Institut Mikrobiologie II, Tübingen
[]: Stammnummer in der Institutssammlung

Bakteriophagen

Die verwendeten Bakteriophagen P1, λ, T4, T5, T2, K3, BF23, Tu1a, Tu1b und TUC stammen aus der Phagensammlung dieses Instituts. χ-Phagen wurden von J. Adler (University of Wisconsin, Madison) zur Verfügung gestellt.

2.4. Kulturbedingungen

Vorkulturen, die mit Zellen von TY-Platten oder direkt aus Glycerinröhrchen beimpft worden waren, wuchsen über Nacht in TY-Medium. Hauptkulturen wurden mit 1% dieser Vorkulturen angeimpft und anschließend, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C unter Belüftung durch Schütteln inkubiert (Gyrotory-Waterbath-Shaker G75 oder Controlled Environment-Inkubator-Shaker, beide NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC).

Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 g geerntet oder entsprechend der Beschreibung der einzelnen Versuche weiterverarbeitet. Zellen, die zur Präparation der äußeren Membran oder der Flagellen dienen sollten, wurden sofort weiter verarbeitet. Zellen, aus denen MDO oder Lipide extrahiert werden sollten, konnten bei -20°C eingefroren werden.

2.5. Genetische Methoden

2.5.1. P1-Transduktion

Die Herstellung von P1-Lysaten und die Durchführung von P1-Transduktionen erfolgte nach den Angaben von Miller (53). Transduktantenkolonien wurden vereinzelt und hinsichtlich der jeweils genannten Eigenschaften getestet.

2.5.2. Tests der Transduktanten

Die Fähigkeit der Transduktanten, ohne Zugabe von Uracil (*pyrC*) oder ohne Zugabe von Aromaten (*aroE*) wachsen zu können, wurde auf M9-Minimalplatten getestet.

Die Fähigkeit zum Wachstum ohne Threonin (*thr*) oder ohne Uracil und Arginin (*carB*) wurde auf Vogel-Bonner-Minimalplatten geprüft.

Die Verwertung von Guanosin oder Adenosin (*deoB*) wurde auf Vogel-Bonner-Minimalplatten mit den entsprechenden Nucleosiden als einziger C-Quelle untersucht.

Tests auf den Chemotaxis- und den Porinphänotyp von Transduktanten sind unter 2.11 und 2.9 beschrieben. Der Test auf Resistenz gegen χ-Phagen erfolgte wie unter 2.14.1. beschrieben.

2.5.3. Isolierung von Revertanten mit chemotaxis-positivem Phänotyp

Die Revertantenisolierung erfolgte mit Hilfe eines Schwärmtests auf Trypton-Schwärmplatten, der nicht wie üblich 5-6 Stunden, sondern über Nacht inkubiert wurde. Nach dieser verlängerten Inkubation sind auf den Schwärmplatten keilförmige Sektoren erkennbar, in denen wieder Schwärmringe ausgebildet werden. Aus dem äußersten Bereich dieser Sektoren wurden Zellen abgeimpft und vereinzelt. Die so gewonnenen Einzelkolonien wurden mehrmals erneut ausgestrichen und im Schwärmtest überprüft.

2.6. MDO-Analyse

2.6.1. MDO-Extraktion

Zur Bestimmung des Gesamt-MDO-Gehalts eines Stammes wurde das Zellsediment einer 0,5 l-Kultur in 0,5% Pepton-Medium mit 5 ml 50% kaltem Ethanol 1 Std. bei 4°C extrahiert. In Ethanol unlösliches Material ließ sich durch 15 min. Zentrifugation bei 8000 g entfernen. Das hierbei entstehende Sediment enthält Lipide und Proteine, der Überstand MDO und niedermolekulare Substanzen.

Der Überstand wurde zur Reinigung von Restlipid und Proteinen einer Lipidextraktion nach Bligh-Dyer (7) wie unter 2.7.1. beschrieben unterworfen. Die wässrige Phase des Bligh-Dyer-Extraktes wurde getrocknet und in 1 ml Säulenchromatographie-Puffer aufgenommen.

Für die MDO-Substituenten-Analyse wurden 20 l-Zellkulturen (je 2 10-l-Fermenter mit Blattrührer, Belüftung) bis zur späten logarithmischen Phase in 1% Pepton-Medium gezüchtet. Das Zellsediment wurde entsprechend der größeren Zellmenge mit 80 ml 50% kaltem Ethanol extrahiert. Die weiteren Extraktionsschritte wurden ebenfalls in entsprechend größeren Volumina durchgeführt.

2.6.2. Biogel P6-Säulenchromatographie

Der MDO-Extrakt wurde zur Reinigung von niedermolekularen Substanzen einer Biogel P6-Säulenchromatographie unterworfen. Zu diesem Zweck wurden je nach Bedarf 2 unterschiedlich große Säulen verwendet.

Nach Extraktion einer 0,5 l-Bakterienkultur wurde eine Säule mit 33 ml Bettvolumen eingesetzt. Als Puffer diente eine 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung mit 7% Isopropanol. Während des Laufs wurden mit einem Fraktionssammler (2070 Ultrorac II, LKB Bromma) 30 Fraktionen zu je

1,4 ml aufgefangen. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde mit einer Schlauchpumpe (2115 Multiperrex, LKB Bromma) auf 0,33 ml/Min. eingestellt.

Zur Aufarbeitung von 20 l-Zellkulturen wurde eine Säule mit 190 ml-Bettvolumen verwendet. Als Puffer diente in diesem Fall ein 10 mM Tris/HCl-Puffer pH: 7,3, der außerdem 0,1 N LiCl und 7% Isoprapanol enthielt. Das Fraktionsvolumen betrug 6 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 0,65 ml/Min. (Peristaltic Pump P3, Pharmacia).

2.6.3. MDO-Zuckerbestimmung

Zur Bestimmung der Elutionszeit von MDO wurden die Biogel P6-Säulen mit gereinigtem, radioaktiv markiertem MDO geeicht. Hierzu wurde mit 2-^{3}H-Glycerin markiertes MDO verwendet, das wie in Ref. (23, 72) beschrieben, gewonnen wurde.

Der Zuckernachweis erfolgte, indem zunächst je 100 µl aller 30 Fraktionen im Anthron-Test gemessen wurden. Der Gesamt-MDO-Gehalt einer Kultur wurde bestimmt, indem die dem MDO-Gipfel zugeordneten Fraktionen vereinigt und auf 300 µl eingeengt wurden. Von diesen 300 µl wurden je nach Zuckergehalt 10, 50 oder 100 µl im Anthron-Test gemessen. Auf diese Weise konnten auch geringe Gesamt-MDO-Mengen noch ermittelt werden. Der zunächst in µg Glucose/Kultur berechnete Zuckergehalt wurde anschließend auf µg Glucose/10^{9} Zellen standardisiert. Zur Erstellung eines MDO-Zuckerprofils wurde der MDO-Gehalt jeder einzelnen Fraktion in µg Glucose/10^{9} Zellen berechnet.

2.6.4. Anthron-Test

In konzentrierter Schwefelsäure entstehen Furfuralderivate von Hexosen, die mit Anthron einen blaugrünen Farbstoff bilden, der photometrisch gemessen werden kann. Der Test kann ohne vorherige Hydrolyse durchgführt werden und ermöglicht die Bestimmung des Gesamtgehalts neutraler Hexosen in der Probe (82).

Die Testlösung enthielt 500 mg Anthron und 10 g Thioharnstoff gelöst in 1 l 72% Schwefelsäure. Für die Messung wurden 500 µl dieser Lösung mit 100 µl der Probe gemischt und 15 Min. auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen konnte die Absorption bei 620 nm bestimmt werden (Zeiss-Photometer PM 4). Zur Bestimmung der Hexosekonzentration in der Probe diente eine Glucose-Eichlösung.

2.6.5. Quantitative Bestimmung der MDO-Substituenten

2.6.5.1. Nachweisreaktionen zur Bestimmung von Glycerin-1-Phosphat, Succinat und Phosphoethanolamin

Die Menge an Glycerin und Succinat kann mit $NADH_2$ verbrauchenden Enzymreaktionen ermittelt werden. Der $NADH_2$-Verbrauch dient dabei als Maß für das jeweils eingesetzte Substrat und kann photometrisch gemessen werden. Im einzelnen handelt es sich um folgende Testreaktionen:

<u>Glycerin-Nachweis</u>

Glycerin+ATP	⇒	Glycerinphosphat	+ADP	[1]
ADP +PEP	⇒	Pyruvat	+ATP	[2]
Pyruvat +$NADH_2$	⇒	NAD^+	+Lactat	[3]

Succinat-Nachweis:

Succinat + CoA + GTP ⇒ Succinyl-CoA + GDP + P_i [4]

GDP + PEP ⇒ Pyruvat + GTP [5]

Pyruvat + $NADH_2$ ⇒ NAD^+ + Lactat [6]

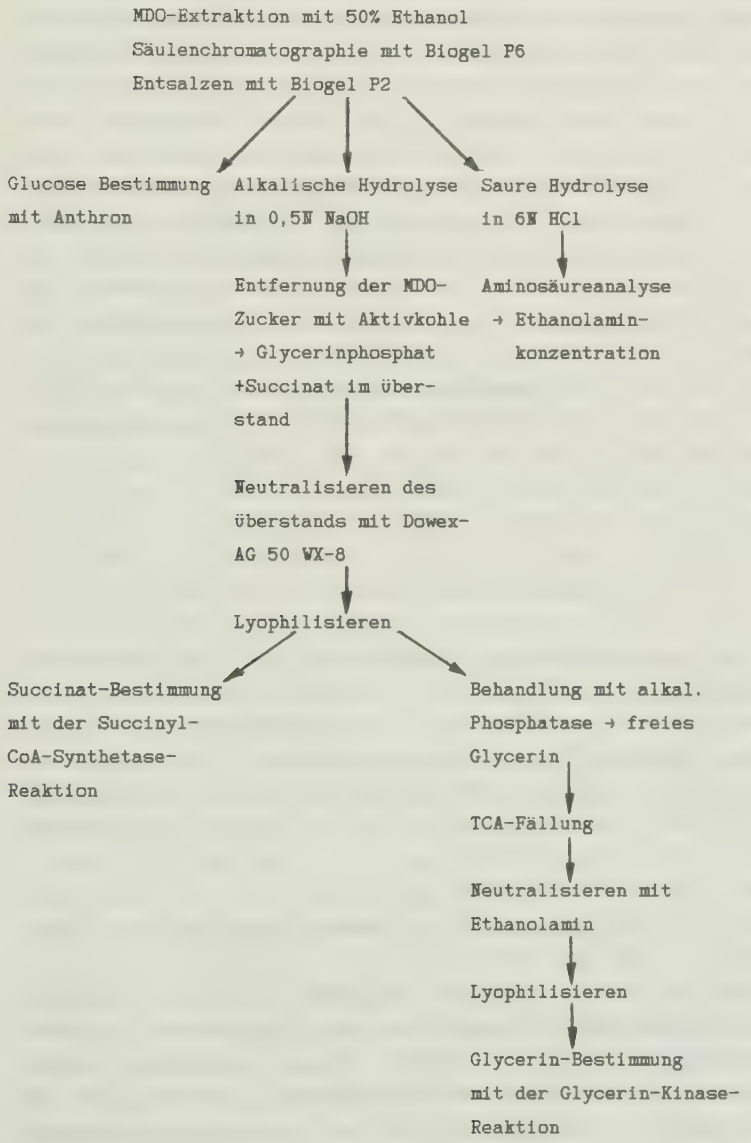
Enzyme: 1 Glycerin-Kinase
2,5 Pyruvat-Kinase
3,6 Lactat-Dehydrogenase
4 Succinyl-CoA-Synthetase

Die 3. Reaktion ist in beiden Fällen die eigentlich gemessene Reaktion, während die 1. Reaktion die Spezifität des Tests bedingt.

Für beide Nachweisreaktionen ist freies Glycerin bzw. Succinat nötig, d.h. MDO müssen vor dem Test hydrolysiert werden. Beim Glycerin-Nachweis tritt eine weitere Schwierigkeit auf, da die Glycerin-Kinase-Reaktion als Substrat Glycerin benötigt und nicht das an MDO gebundene Glycerin-1-Phosphat, das bei der Hydrolyse von MDO freigesetzt wird. Daher muß der Phosphatrest vor dem Test durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgespalten werden.

Ethanolamin kann nach Hydrolyse der MDO-Zuckerketten durch Aminosäureanalyse nachgewiesen werden.

2.6.5.2. Übersicht über den Analysengang



2.6.5.3. Glycerin-Nachweis

Der Glycerin-Test wurde im Einzelnen wie in Ref. (72, 24) beschrieben durchgeführt. Die MDO enthaltenden Fraktionen des Biogel P6-Säulenlaufs wurden vereinigt, eingeengt, mit Biogel P2 entsalzt und anschließend 45 Min. in 0,5 N NaOH hydrolysiert. Unter diesen Bedingungen wird Glycerin-1-Phosphat von MDO freigesetzt (42). Zur Abspaltung des Phosphatrests von Glycerin-1-Phosphat wurde eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase durchgeführt. Das nun frei vorliegende Glycerin konnte mit Hilfe der Glycerin-Kinase-Reaktion gemessen werden. Zu diesem Zweck wurde die Triglycerid-Testkombination von Boehringer verwendet. Zum Nachweis möglicher Verluste während des Analysengangs wurde vor dem Entsalzen 2-^{3}H-Glycerin-markiertes MDO als interner Standard zugegeben. Die Isolierung des markierten MDO erfolgte wie in Ref. (23, 72) beschrieben.

2.6.5.4. Succinat-Nachweis

2 von insgesamt 4 ml entsalzter MDO-Lösung (aus 20 l-Zellkultur) wurden in 0,5 N NaOH 45 Min. bei 100°C hydrolysiert, um die als *O*-Ester gebundenen Succinatreste vom MDO-Zuckergerüst abzuspalten.

Nach der Hydrolyse wurden 50 mg Aktivkohle zugegeben und 5 Min. kräftig gemischt, um eine Adsorption der MDO-Zuckerketten an die Aktivkohle zu erzielen. Die Aktivkohle wurde durch Zentrifugation bei 8000 g wieder entfernt und zweimal mit deion. Wasser gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit Dowex AG 50 WX-8 (H^+-Form) neutralisiert. Nach Sedimentation des Ionenaustauscher-Harzes wurde der Überstand abgenommen, das Harz wurde noch zweimal mit deion. Wasser gewaschen. Waschwasser und Überstand wurden vereinigt, lyophilisiert und anschließend in 500 µl 50 mM Triethanolamin-Puffer

(930 mg Triethanolaminhydrochlorid/100ml , eingestellt auf pH:8,3 mit 1N NaOH) aufgenommen.

200 µl hiervon wurden für eine Succinat-Bestimmung mit der Succinyl-CoA-Synthetase-Reaktion verwendet. Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 2,97 ml folgende Bestandteile:

- 42 mM Triethanolaminpuffer pH:8,3
- 0,2 mM Guanosin-5-Triphosphat
- 0,2 mM Coenzym A
- 0,7 mM Phosphoenolpyruvat
- 3,4 mM $MgCl_2$
- 3,4 mM KCl
- 0,2 mM NADH
- 27 Einheiten Lactat-Dehydrogenase und
  20 Einheiten Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel

Dieser Ansatz wurde gemischt, und die Extinktion bei 366 nm gemessen (Eppendorff Photometer 1101 M), dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,25 Einheiten Succinyl-CoA-Synthetase (aus Schweineherz) gestartet.

Die Abnahme der Extinktion innerhalb von 20 Min. bei Raumtemperatur, die der Abnahme des NADH-Gehalts in der Probe entspricht, wurde als Maß für den Succinatgehalt in der Probe benutzt. Die Konzentration an Succinat wurde an Hand von Succinat-Eichwerten (0,5-1,5 µmol) bestimmt, die parallel zu den MDO-Proben aufgearbeitet worden waren.

2.6.5.5. Ethanolamin-Nachweis

MDO wurden für den Ethanolamin-Nachweis 18 Std. bei 110°C in 6 N HCl hydrolysiert. Unter diesen Bedingungen wird Ethanolamin von den MDO-Zuckerketten freigesetzt (der Phosphatrest von Phosphoethanolamin wird ebenfalls abgespalten). Die Analyse erfolgte im Einsäulenverfahren

mit einem Aminosäure-Analysator LC 6005 von Biotronik. Als Eichstandard wurden 10 nMol Ethanolamin aufgetragen. Norleucin wurde als interner Standard vor der Hydrolyse zugegeben.

2.7. Lipid-Analyse

2.7.1. Lipid-Extraktion nach Bligh-Dyer (7)

Zellen wurden in 2 ml 0,5% Pepton-Medium mit $18,5 \times 10^4$ Bq [1-^{14}C]-Acetat bis zu einer OD von ca. 0,5 gezüchtet. Um *dgk* Stämme osmotisch zu schützen (67), wurde 0,05 M NaCl zum Medium zugegeben.

Das Zellpellet wurde in 0,8 ml NaCl, pH 2 aufgenommen, und 3 ml Chloroform/Methanol im Verhältnis 1/2 zugegeben. Nach 1 Std. Stehen bei Raumtemperatur konnte das ausgefällte Protein durch 10 min. Zentrifugation bei 5000 g entfernt werden. Zur Phasentrennung wurden zum Überstand 1 ml Chloroform und 1 ml NaCl, pH 2 zugegeben und anschließend bei niedriger Umdrehungszahl 5 Min. zentrifugiert.

2.7.2. Chromatographie der neutralen Lipide

Die getrockneten Lipidphasen wurden in 100 µl Chloroform/Methanol im Verhältnis 2/1 aufgenommen und auf eine zuvor mit Aceton äquilibrierte Kieselgel-60-Glasplatte als ca. 1 cm langer Strich aufgetragen. Als Laufmittel wurde zur Trennung der neutralen Lipide Äther/Hexan/Eisessig im Verhältnis 70/30/1 verwendet.

2.7.3. Radioaktivitätsmessung der einzelnen Lipidbanden

Um die Lage der radioaktiv markierten Lipidbanden lokalisieren zu können, wurde eine Autoradiographie des Chromatogramms hergestellt. Der Autoradiographiefilm wurde anschließend auf die Kieselgelplatte aufgelegt, und das Bandenmuster durchgepaust.

Die Lipidbanden wurden nach vorherigem Anfeuchten der Kieselgelplatte ausgekratzt, und die Lipide mit 1 ml Chloroform/Methanol im Verhältnis 2/1 aus dem Kieselgel extrahiert. Nach 15 Min. wurde das Kieselgel in der Eppendorff-Zentrifuge abgetrennt. 100 µl des Überstands wurden getrocknet und unter Zusatz von 3 ml Quickszint 501 im Scintillationszähler (Betaszint BF 5000, Berthold) gemessen.

Die Radioaktivität der einzelnen Lipidbanden wurde als Prozentsatz der Gesamtlipid-Radioaktivität eines Stammes bestimmt.

2.8. *In vivo* Nachweis der Phosphoglycerin-Transferase I-Aktivität

2.8.1. Isolierung von Arbutin-Phosphoglycerin

Zur Isolierung von radioaktiv markiertem Arbutin-[2-^{3}H]-Phosphoglycerin wurden die Zellen in 5 ml LOS-Medium (43), das zusätzlich 17 mM Arbutin und $3{,}7 \times 10^4$ Bq/ml [2-^{3}H]-Glycerin enthielt, bis zu einer OD von ca. 1,0 gezüchtet. Um das schlechte Wachstum des Stammes DF214 zu verbessern, wurde die Osmolarität des Mediums durch Zugabe von 0,07 M NaCl leicht erhöht.

Der durch Zentrifugation bei 8000 g gewonnene Kulturüberstand wurde mit 100 mg Aktivkohle gemischt und 15 Min. gerührt, um Arbutin und Arbutinderivate zu adsorbieren (37). Nach anschließender Zentrifugation wurde das Aktivkohlesediment mehrmals mit deion. Wasser gewaschen und danach zweimal mit 15% (v/v) Pyridin unter starkem Schütteln eluiert. Unter diesen Bedingungen werden Arbutin und Arbutin-Phosphoglycerin von der Aktivkohle abgelöst (37).

Die Aktivkohle wurde nun durch Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Der klare Pyridinextrakt wurde zur Entfernung des Pyridins lyophilisiert. Die trockene Probe wurde in 1 ml 25% (v/v) 1-Propanol aufgenommen und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (0,2 cm^2 × 15 cm), die ebenfalls mit 25% 1-Propanol äquilibriert worden war, aufgetragen.

Diese Säule wurde mit 5 ml 25% 1-Propanol gewaschen und dann mit einem linearen Salzgradienten (0 bis 0,05 M LiCl in 18 ml 25% 1-Propanol) mit einer Flußgeschwindigkeit von 4,2 ml/Std. eluiert (10). Während des Laufs wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt, und ihre Radioaktivität im Scintillationszähler (Betaszint BF 5000, Berthold) unter Zugabe von Quickszint 402 gemessen.

Markierte Fraktionen, die bei einer Salzkonzentration

von 0,025 M LiCl und der entsprechenden Leitfähigkeit von 90 µS eluiert wurden, wurden vereinigt und als Markierungsmaterial für den folgenden Großansatz verwendet.

2.8.2. Chemische Identifizierung von Arbutin-Phosphoglycerin

Um chemisch nachweisbare Mengen an Arbutin-Phosphoglycerin isolieren zu können, wurden Zellen in 200 ml LOS-Medium (43) mit 0,07 M NaCl gezüchtet und in der späten logarithmischen Phase geerntet.

Zum Kulturüberstand wurde das [2-^{3}H]-markierte Arbutin-Derivat aus Versuch 2.8.1. zugegeben, und der Ansatz anschließend mit 4 g Aktivkohle 30 Min. lang gerührt. Die Aktivkohle wurde durch Zentrifugation sedimentiert, zweimal mit deion. Wasser gewaschen und zweimal mit je 40 ml 15% (v/v) Pyridin unter heftigem Rühren eluiert.

Nach Abtrennung der Aktivkohle durch Zentrifugation und Filtration wurde der so gewonnene klare Pyridinextrakt mehrmals lyophilisiert, um Pyridin vollständig zu entfernen. Die trockene Probe wurde in 5 ml 7% (v/v) 1-Propanol aufgenommen und über eine Sephadex G10-Säule (0,79 cm^2 × 42 cm) aufgetrennt, um nicht modifiziertes Arbutin von seiner modifizierten Form zu trennen. Während des Laufs wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt, und ihre Radioaktivität unter Zusatz von Quickszint 402 im Scintillationszähler gemessen. Markierte Fraktionen wurden vereinigt, auf ein Volumen von 1 ml eingeengt und über eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetrennt.

Für diesen Säulenlauf galten die gleichen Bedingungen wie unter 2.8.1. beschrieben. Alle Fraktionen wurden auf ihre Radioaktivität und ihren Arbutin-Phosphoglycerin-Gehalt untersucht.
Arbutin wurde mit Hilfe seines Hexose- und seines Phenolanteils nachgewiesen.
Der Hexoseanteil wurde mit der Anthron-Reaktion (82) ge-

messen, indem nicht eine Glucose-, sondern eine Arbutinlösung als Eichstandard verwendet wurde.

Der Phenolanteil wurde spektrometrisch durch Messung der Absorption bei 310 nm nachgewiesen. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption einer 0,1 M Arbutinlösung um 0,125 Einheiten höher, wenn der pH-Wert der Probe von pH 7,0 auf pH 11,0 erhöht wird. Daher wurde die Änderung der Absorption bestimmt, die auftrat, nachdem der Probe 0,1 Volumen an 1 M K_2CO_3 zugegeben worden war. Mit Hilfe dieser Absorptionsänderung läßt sich der Arbutingehalt der Probe ohne Überlagerung durch andere UV absorbierende Substanzen bestimmen (10).

2.8.3. Dünnschichtchromatographie von Arbutin-Phosphoglycerin

Um das Vorhandensein von Phosphoglycerin im isolierten Arbutinderivat nachzuweisen, wurde dieses wie unter 2.8.1. beschrieben isoliert und auf ein Volumen von 0,5 ml eingeengt. Diese Probe wurde 45 Min. bei 100°C in 0,5 N NaOH hydrolysiert und anschließend mit Dowex 5-WX-8 (H^+-Form) neutralisiert. Das Ionenaustauscherharz wurde durch Sedimentation entfernt und anschließend zweimal mit deion. Wasser gewaschen. Die hierbei entstehenden Überstände wurden vereinigt und lyophilisiert.

Die trockenen Proben wurden in 50 µl deion. Wasser aufgenommen und auf eine Silica Gel 60-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen. Als Vergleichsproben wurden daneben [^{3}H]-markiertes Glycerin und [^{3}H]-markiertes Glycerin-3-Phosphat aufgetragen. Als Laufmittel diente 1-Propanol/1 M Ammoniumformiat im Verhältnis 9/4 (10).

Radioaktive Flecken wurden durch Auflegen eines ^{3}H-sensitiven Röntgenfilms (LKB-Ultrofilm) sichtbar gemacht.

2.9. Qualitative Bestimmung des Poringehalts der äußeren Membran

2.9.1. Isolierung äußerer Membranen

Äußere Membranen wurden durch einen Lysozym-EDTA-Aufschluß von Zellen mit anschließender Solubilisierung der Cytoplasmamembran durch Triton-X-100-haltigen Puffer isoliert (34).

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 50 ml 0,5% Pepton-Medium (bei Bedarf mit speziellen Zusätzen) bis zu einer OD von ca. 0,2 gezüchtet, durch Zentrifugation bei 8000 g geerntet und in 0,2 M Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf Eis gestellt und nacheinander folgende Lösungen zugegeben:

- 0,5 ml 1 M Saccharose in 0,2 M Tris/HCl pH 8,0
- 5 µl 100 mM EDTA
- 62,5 µl Lysozymlösung (1 mg/ml)
- 1,0 ml deion. Wasser

Nach Sphäroblastenbildung wurden 2,12 ml Extraktionspuffer (2% Triton-X-100, 10 mM $MgCl_2$ in 50 mM Tris/HCl pH 8,0) zugegeben und kräftig gemischt. Die stark visköse Lösung wurde mit 50 µl Desoxyribonuclease-Lösung (1 mg / ml) versetzt und nach Abnahme der Viskosität 1 Std. bei 50 000 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment, das die äußere Membran enthält, wurde dreimal mit deion. Wasser gewaschen (Zentrifugation 10 Min. bei 13 000g). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in 20 µl deion. Wasser resuspendiert und bei -20°C eingfroren.

2.9.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung der Proteine der äußeren Membran erfolgte in einem modifizierten Elektrophorese-System nach Lugtenberg (49). Zur Trennung der Porine wurde dem

Trenngel Harnstoff zugesetzt (57). Herstellung des Gels und Durchführung der Elektrophorese erfolgten nach Standardmethoden (36). Das Trenngel enthielt 8,6% oder 11% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 8 M Harnstoff in 0,75 M Tris/HCl pH 8,8.

Das Sammelgel hatte folgende Zusammensetzung: 3% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid, 0,1% SDS in 0,25 M Tris/HCl pH 6,8.

Die Proben wurden 1:1 in Auftragspuffer (4% SDS, 20% Glycerin, 10% Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau, 0,125M Tris/HCl pH 6,8) verdünnt und vor dem Auftragen gekocht.

Als Elektrophoresepuffer diente 0,192 M Glycin, 0,1% SDS in 0,25 M Tris/HCl pH 8,0. Der Elektrophorese-Lauf fand bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 13 mA statt.

Die Färbung der Proteine erfolgte 1 Std in 0,03% Serva-Blau G in 50% Methanol, 10% Essigsäure, entfärbt wurde in 10% Essigsäure.

2.10. Flagellenisolierung

Die Isolierung der Flagellen erfolgte wie von Lugtenberg (50) beschrieben.

Die Zellen wurden hierzu in 1 l 10% Trypton-Medium über Nacht gezüchtet, durch Zentrifugation bei 5000 g geerntet und in 80 ml 0,1 M Tris/HCl ph 7,8 resuspendiert. Die Flagellen wurden unter Kühlung durch Behandlung im Ultrathurax (Bachhofer) abgeschert. Die Zellsuspension wurde daraufhin 1:6 in Tris/HCl pH 7,8 verdünnt und zur Abtrennung ganzer Zellen 10 Min. bei 12 000 g zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthält die Flagellen, die durch 1-stündige Zentrifugation bei 140 000 g abgetrennt wurden. Das Flagellensediment wurde

in 0,2 ml deion. Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.11. Chemotaxistest auf Trypton-Schwärmplatten

Der Chemotaxisphänotyp der Zellen wurde mit dem von Adler beschriebenen Schwärmtest (1) untersucht. Hierfür wurden 20 µl einer frisch gewachsenen Bakterienkultur (TY-Medium) auf eine Trypton-Schwärmplatte aufgetropft, oder frisch gewachsene Zellen direkt von TY-Platten mit Hilfe eines Zahnstochers in eine Trypton-Schwärmplatte eingestochen. In beiden Fällen wurden die Platten bis zur Ausbildung von Schwärmringen, d.h. 5-6 Std. bei 37°C inkubiert.

Chemotaxispositiv sind solche Zellen, die in der Lage sind, 2 deutlich abgegrenzte Schwärmringe auszubilden. Zellen mit chemotaxisnegativem Phänotyp bilden dagegen einen kleinen, diffusen Schwärmhof, der keine Ringe aufweist. Nicht motile Zellen bleiben an der Inokulationstelle liegen.

2.12. Test auf Schleimbildung

Die Schleimbildung konnte direkt an Hand des Aussehens der Kolonien nach Inkubation bei 27°C beurteilt werden. Schleimende Zellen bilden auf M9-Platten große, auseinanderlaufende, weiße Kolonien, während Nicht-Schleimer kleine, mehr gelbliche Kolonien bilden.

2.13. Test auf Sensitivität gegenüber Bacitracin

2×10^8 Zellen einer Übernachtkultur in TY-Medium wurden in 3 ml 1/8 TY- Weichagar (mit 20 µg/ml Thiamin) auf 1/8 TY-Platten ausplattiert. Auf die erstarrte Weichagarschicht wurden Filterrondellen aufgelegt, die mit 15 µl einer Bacitracinlösung (250 mg/ml) getränkt waren. Der Testansatz wurde 24 Std. bei 37°C inkubiert.

Der Hemmhofdurchmesser diente als Maß für die Sensitivität der Zellen gegenüber Bacitracin. Er wurde für jeden Stamm mit 2 Testplatten, auf die je 3 Filterrondellen aufgelegt worden waren, ermittelt.

2.14. Phagentests

2.14.1. Test auf Sensitivität gegenüber χ-Phagen

2×10^8 Zellen einer Übernachtkultur in TY-Medium wurden zusammen mit 0,1 ml unterschiedlicher χ-Phagen-Verdünnungen in 3 ml Schwärmagar auf Trypton-Platten ausplattiert. Dieser Testansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bewertung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Phagen erfolgte an Hand der Plaqueanzahl und der Plaquemorphologie (Größe, Trübung).

Eine andere Methode zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber χ-Phagen bestand darin, Trypton-Schwärmplatten mit 0,1 ml unverdünntem χ-Phagenlysat pro Platte herzustellen und den Schwärmtest wie unter 2.11. beschrieben, durchzuführen. χ-resistente Zellen, die beweglich sind, bilden auch in Anwesenheit der Phagen normale Schwärmringe aus, χ-resistente Zellen, die unbeweglich sind, wachsen an der Inokulationsstelle, χ-sensitive Zellen werden lysiert.

2.14.2. Test auf Sensitivität gegenüber Tu1a- und Tu1b-Phagen

Die Tests mit den Porinspezifischen Phagen Tu1a (OmpF) und Tu1b (OmpC) wurden als Querstrichtest auf TY-Platten bzw. TY-Platten ohne NaCl-Zusatz durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden zunächst 100 µl des unverdünnten Phagenlysats auf einer der oben genannten Platten quergestrichen. Im rechten Winkel dazu wurden die Zellen ausgestrichen. Als Kontrollen wurden auf jede Platte auch die jeweiligen Wildtyp- oder Vergleichsstämme mit aufgetragen. Die Bewertung der Empfindlichkeit erfolgte immer im Vergleich zur Kontrolle.

2.14.3. Test auf Sensitivität gegenüber TUC-Phagen

Der Test auf Sensitivität gegenüber den schleimspezifischen TUC-Phagen wurde unter Bedingungen maximaler Schleimsynthese, d.h. in Anwesenheit von Glucose (M9-Platten) bei niedriger Temperatur (27°C) als Querstrichtest durchgeführt.

2.14.4. Sonstige Phagentests

Phagentests mit anderen, unter 2.14.1, 2.14.2. und 2.14.3. nicht aufgeführten Phagen, wurden als Tropftest auf TY-Platten durchgeführt.

Hierzu wurden 2 × 10^8 Zellen einer übernachtkultur in TY-Medium in 3 ml TY- Weichagar auf TY-Platten ausplattiert. Auf die erstarrte Weichagarschicht wurden die unterschiedlichen Phagenlysate bzw. deren Verdünnungen aufgetropft, und die Platten anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Als resistent wurden die Zellen dann bewertet, wenn das unverdünnte Phagenlysat zu keiner erkennbaren Lyse

der Zellen führte. Unterschiedliche Sensitivitätsgrade wurden durch Auftropfen von Phagenverdünnungen ermittelt, indem die letzte noch zur Lyse der Zellen führende Verdünnungsstufe bei den verschiedenen Bakterienstämmen verglichen wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Stammkonstruktionen

3.1.1. Transduktion einer definierten *mdoA* Mutation aus dem Stamm T10GP in den chemotaxispositiven Stamm MA1008

Um Auswirkungen der *mdoA* Mutation auf den Phänotyp der Zellen untersuchen zu können, war es zunächst nötig, ein *E.coli* Stammpaar zu konstruieren, das sich genetisch nur hinsichtlich dieser Mutation unterscheidet. Da es auf Grund von Vorversuchen außerdem Hinweise darauf gab, daß das Fehlen von MDO einen Einfluß auf das Chemotaxis-Verhalten der Zellen hat, wurde als Elternstamm der chemotaxispositive Stamm MA1008 *pyrC* ausgewählt.

In diesen Stamm wurde nun die von Kennedy schon kartierte und charakterisierte *mdoA* Mutation (9, 94) aus dem Stamm T10GP durch P1-Transduktion übertragen. Als Selektionsmerkmal konnte in diesem Fall das neben *mdoA* liegende Gen *pyrC* verwendet werden.

Nach einer solchen Transduktion wurden die Auswirkungen der *mdoA* Mutation auf das chemotaktische Verhalten der Zellen überprüft. Tatsächlich waren 87,5% der *pyrC*$^+$ Transduktanten (getestet 30) nicht mehr in der Lage, auf Trypton-Schwärmplatten normale Chemotaxisringe auszubilden (Abb. 4; S. 44).

Da kein schnelles Testverfahren für MDO vorhanden ist, konnte der MDO-Gehalt der Transduktanten nur stichprobenhaft überprüft werden. So wurde aus 2 Transduktanten mit Wildtyp-Schwärmverhalten und 3 Transduktanten mit mutiertem Schwärmphänotyp nach Anzucht in niedrig osmolarem Medium (0,5% Pepton-Medium) MDO isoliert. Eine MDO-Gesamtbestimmung nach 2.6.1.-2.6.4. ergab für die

beiden Transduktanten mit Wildtyp-Schwärmverhalten einen MDO-Gehalt von 0,87 bzw. 1,10 µg Glucose/10^9 Zellen, während die drei Transduktanten mit mutiertem Schwärmphänotyp lediglich Werte von 0,02; 0,05 und 0,07µg Glucose/10^9 Zellen aufwiesen. Es ist demnach möglich, mit Hilfe des Schwärmphänotyps *mdoA* Mutanten zu selektionieren. Für die weiteren Experimente wurde die Transduktante mit dem niedrigsten MDO-Gehalt ausgewählt und im folgenden als TA1008 bezeichnet.

3.1.2. Konstruktion einer *mdoA pyrC* Doppelmutante

Um bei weiteren Transduktionsexperimenten mit der *mdoA* Mutante die Möglichkeit zur Selektion auf *pyrC*$^+$ zu haben, wurde die *pyrC* Mutation aus dem Stamm MA1008 zurück in die *mdoA pyrC*$^+$ Transduktante TA1008 transduziert.

Zu diesem Zweck wurde von dem chemotaxispositiven Stamm R2041, der das Transposon *zcd*::Tn*10* zwischen *mdoA* und *putA* bei 22,9 Min. trägt (H. Rotering, persönliche Mitteilung) und zudem *mdoA*$^+$ und *pyrC*$^+$ ist, ein P1-Lysat hergestellt und zur Transduktion in den Stamm MA1008 verwendet. Tetracyclinresistente Transduktanten, die gleichzeitig *pyrC* geblieben waren, wurden zur Herstellung eines weitern P1-Lysats verwendet, welches nun dazu diente, eine Transduktion in den Stamm TA1008 *mdoA pyrC*$^+$ auszuführen. Unter den tetracyclinresistenten Transduktanten wurden solche gesucht, die *pyrC* geworden waren, aber den mutierten Schwärmphänotyp behalten hatten. Aus zwei derartigen Transduktanten wurde MDO isoliert. Die MDO-Gesamtbestimmung nach 2.6.1.-2.6.4. ergab bei beiden einen Wert unter 0,05 µg Glucose/10^9 Zellen (Stamm: TA1007). Um weitere genetische Experimente zu erleichtern, wurde das in diese Transduktanten eingeführte Transposon *zcd*::Tn*10* bei einer Transduktante auf Bochner-Platten (8) kuriert. Dieser Stamm wird im folgenden als TA1009 bezeichnet. Das MDO-Elutionsprofil dieser

mdoA Mutante im Vergleich zum *mdoA* Wildtyp MA1008 ist in Abb. 3 gezeigt.

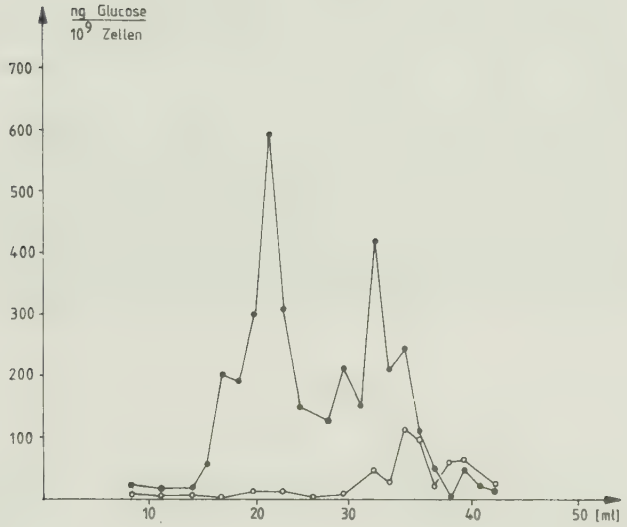


Abb. 3: MDO-Zuckerprofile der Stämme MA1008 und TA1009

Zellen wurden bis zu einer OD von ca. 0,5 bei 37°C in 0,5% Pepton-Medium gezüchtet. MDO wurden durch Extraktion mit 50% Ethanol und anschließende Lipidextraktion nach Bligh-Dyer (7) gewonnen. Zur weiteren Reinigung von niedermolekularen Substanzen wurde eine Biogel P6 Säulenchromatographie durchgeführt. Der MDO Gehalt jeder einzelnen Fraktion wurde mit Hilfe der Anthron-Reaktion bestimmt.
Bezeichnungen: ● MA1008 *mdoA*$^+$; ○ TA1009 *mdoA*.

3.1.3. Übertragung der *mdoA* Mutation in den Stamm RZ600

Um die Auswirkungen der *mdoA* Mutation in einem anderen chemotaktisch positiven Stamm testen zu können, wurde sie in den Stamm RZ600 transduziert. Zu diesem Zweck wurde wieder ein P1-Lysat des Stammes TA1007 *mdoA zcd*::Tn*10* hergestellt und eine Transduktion in den Stamm RZ600 ausgeführt. Tetracyclinresistente Transduktanten wurden nach 2.11. auf ihren Chemotaxis-Phänotyp getestet.

Auch in diesem Stamm führt die Übertragung der *mdoA* Mutation zur Entstehung von Transduktanten mit mutiertem Schwärmphänotyp. Bei einer dieser Transduktanten wurde eine MDO Gesamtbestimmung durchgeführt, die einen Wert von 0,06µg Glucose/10^9 Zellen ergab.

3.2. Phänotypische Charakterisierung einer *mdoA* Mutante

3.2.1. Charakterisierung des Chemotaxis-Phänotyps

3.2.1.1. Chemotaxistest auf Trypton-Schwärmplatten

Auf Trypton-Schwärmplatten kann die chemotaktische Antwort der Zellen auf L-Serin und L-Aspartat getestet werden (1). Bakterien, die an einer Stelle der Platte aufgetropft werden, bewegen sich von dieser Stelle fort und bilden Chemotaxisringe aus. Diese Ringbildung kommt durch Konzentrationsgradienten von L-Serin und L-Aspartat zustande, die ihrerseits durch den Stoffwechsel der Bakterien entstehen.

Wildtypstämme (MA1008, RZ600) bilden auf diesen Platten zwei relativ scharf begrenzte Chemotaxisringe, während *mdoA* Mutanten (TA1008, TA1009, RZ1009) nur einen kleinen diffusen Schwärmhof ausbilden. Dieser mutierte Schwärmphänotyp entspricht dem chemotaxisnegativer Mutanten (4, 5). *mdoA* Mutanten haben demnach die Fähigkeit zur Chemotaxis verloren. In Abb. 4 ist dies für die Stämme MA1008, TA1008 und TA1009 gezeigt.

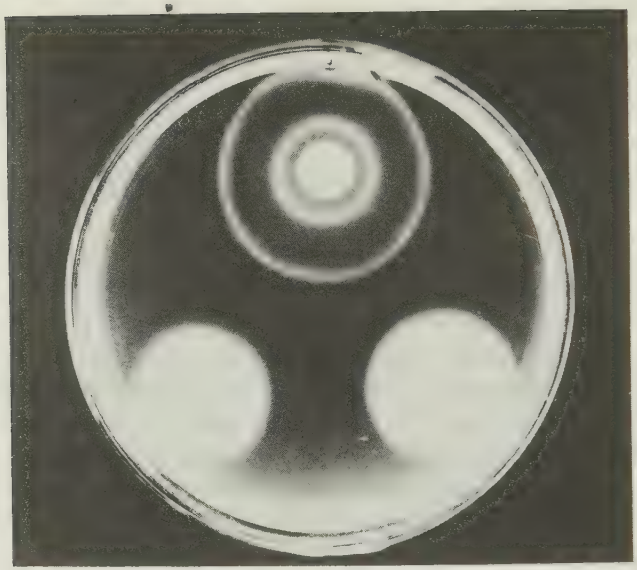


Abb. 4: Chemotaxistest

Trypton-Schwärmplatten beimpft mit 1 Tropfen frisch gezüchteter Bakteriensuspension nach 5-6 stündiger Inkubation bei 37°C. Anordnung: oben: MA1008, links: TA1008, rechts: TA1009.

3.2.1.2. Sensitivität gegenüber χ-Phagen

χ-Phagen benötigen aktive, rotierende Flagellen, um eine Zelle zu infizieren (89). Die Sensitivität der Zellen gegenüber χ-Phagen wurde daher in Schwärmagar bestimmt. Tab. 1 zeigt die Ergebnisse dieses Tests: Auf den Wildtypstämmen MA1008 und RZ600 bilden χ-Phagen große, klare Plaques mit trübem Hof, wobei der Stamm RZ600 empfindlicher ist als der Stamm MA1008. Die *mdoA* Mutanten TA1009 und TA1008 dagegen sind resistent, es sind keine Plaques erkennbar. Im Stammhintergrund des Stammes RZ600

(RZ1009) verhindert die *mdoA* Mutation die Plaquebildung nicht vollständig. χ-Phagen sind hier noch in der Lage, trübe Plaques auszubilden, deren Anzahl gegenüber dem Wildtyp auf ca. 1/3 reduziert ist.

Tab. 1: χ-Phagentest in Schwärmagar

2×10^8 Zellen wurden in 3 ml Schwärmagar zusammen mit 0,1 ml der jeweiligen Phagenverdünnung ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

χ-Phagen Verd.	Stamm MA1008	TA1009	RZ600	RZ1009
10^{-2}	L	0	L	(L)
10^{-4}	~1000	0	L	(~2000)
10^{-6}	50	0	140	(50)

Bezeichnungen: L: konfluente Lyse, (): trübe Plaques, 0: keine Plaques

3.2.1.3. Nachweis der Flagellen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Präparation der äußeren Membran nach der Methode von Hantke (34) werden zusammen mit der Membran auch die Flagellen isoliert. Dies konnte durch eine zweite Präparation, bei der die Flagellen durch Abscheren und anschließende differentielle Zentrifugation isoliert wurden (50), gezeigt werden. Bei der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese läuft die so gewonnene Flagellenpräparation auf gleicher Höhe wie die nach der Membranpräparation auftretende Flagellenbande.

Nach der Auftrennung äußerer Membranen von Wildtypzellen ist diese Flagellenbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 60 000 Dalton deutlich sichtbar. Nach der Auftrennung äußerer Membranen von *mdoA* Mutanten ist sie dagegen nur sehr schwach (im Originalgel sichtbar)

zu erkennen (Abb. 5; S.48).

Eine Reduktion der Flagellenbande tritt auch bei Wildtypzellen auf, wenn diese in Medium mit einem Glucosezusatz von 0,4% gezüchtet werden, d.h. wenn die Flagellensynthese durch Katabolitrepression gehemmt wird (2). Bei Anzucht der Zellen in Medium mit hoher Osmolarität (0,5% Pepton-Medium mit 0,4M NaCl Zusatz) ist ebenfalls eine Reduktion der Flagellenbande zu beobachten. Setzt man dementsprechend Trypton-Schwärmplatten 0,4% Glucose oder 0,4 M NaCl zu, so bilden auch Wildtypzellen keine Chemotaxisringe aus.

3.2.2. Expression der Porine

Die Expression der Porine OmpF und OmpC unterliegt wie die MDO-Synthese der osmotischen Regulation. Um einen Hinweis auf möglicherweise vorhandene Zusammenhänge zwischen beiden Systemen zu erhalten, sollte der Einfluß der *mdoA* Mutation auf die Porinexpression untersucht werden.

Um die Auswirkungen der *mdoA* Mutation auf die Porinexpression deutlich erkennen zu können, wurden die Zellen in niedrig osmolarem Medium (0,5% Pepton-Medium), d.h. unter Bedingungen, die zu hoher MDO-Synthese führen, gezüchtet. Eine Trennung der osmoregulierten Porine OmpF und OmpC wurde in der Gelelektrophorese durch Harnstoffzusatz zum Trenngel erreicht.

Die äußere Membran der Wildtypstämme MA1008 und RZ600 enthält nach Anzucht bei niedriger Osmolarität mehr OmpF als OmpC (91, 39). Dieses Verhältnis von OmpF zu OmpC ist in der äußeren Membran der *mdoA* Mutanten TA1009, TA1008 und RZ1009 zugunsten von OmpC verschoben, d.h. bei niedriger Osmolarität wird mehr OmpC als OmpF in die äußere Membran eingelagert.

Nach Anzucht in Medium mit hoher Osmolarität (0,5% Pepton-Medium mit 0,4M NaCl Zusatz) weist die äußere

Membran von Wildtypzellen einen deutlich höheren Gehalt an OmpC auf als bei niedriger Osmolarität (91, 39). Dieser Effekt ist auch bei *mdoA* Mutanten zu beobachten. Trotzdem bleibt aber die gegenüber dem Wildtyp vorhandene Verschiebung der Porinexpression zugunsten von OmpC auch bei hoher Osmolarität erhalten.

Prinzipiell dasselbe gilt bei einem Verleich der äußeren Membranen von Wildtyp und *mdoA* Zellen, wenn die Anzucht bei niedrigerer Temperatur erfolgt. So enthalten äußere Membranen von Wildtypzellen, die bei 37°C gezüchtet werden, mehr OmpC als äußere Membranen von Zellen, die bei 27°C gezüchtet werden (51). Dies gilt wiederum auch für die *mdoA* Mutanten. Die Verschiebung des Poringehalts der *mdoA* Mutante zugunsten von OmpC bleibt aber auch in diesem Fall erhalten.

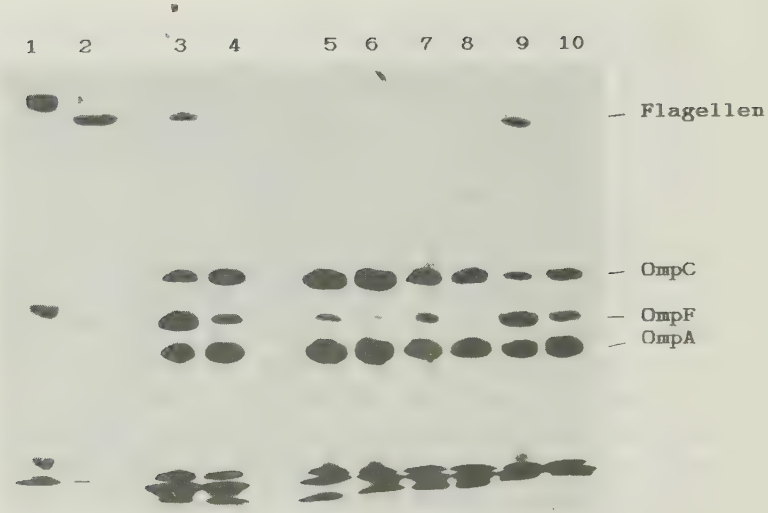


Abb.5: Trennung der Proteine der äußeren Membran nach Anzucht der Zellen in unterschiedlichen Medien

Äußere Membranen wurden nach der Schnellmethode von Hantke (34) präpariert. Die Trennung der Membranproteine erfolgte mittels Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.
1: Proteinstandard: BSA (67 Kd), Ovalbumin (45 Kd), Carboanhydrase (29 Kd), Myoglobin (17,8 Kd) ,
2: Flagellen von MA1008 isoliert nach 2.10,
3: MA1008, 4: TA1009 beide bei 37°C ohne Medienzusatz;
5: MA1008, 6: TA1009 beide bei 37°C mit 0,4M NaCl;
7: MA1008, 8: TA1009 beide bei 37°C mit 0,4% Glucose;
9: MA1008, 10: TA1009 beide bei 27°C ohne Medienzusatz.

3.2.3. Schleimbildung

Nach Inkubation bei 27°C sondern die *mdoA* Mutanten TA1008, TA1009 und RZ1009 im Gegensatz zu den jeweiligen Wildtypstämmen MA1008 und RZ600 Schleim ab. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ist diese Schleimbildung dagegen nicht zu beobachten. Gekoppelt mit dieser Schleimbildung tritt Sensitivität gegenüber schleimspe-

zifischen TUC-Phagen auf, die im Querstrichtest auf M9-Platten mit Glucose als C-Quelle nachgewiesen wurde.

Um zu testen, ob diese Schleimbildung prinzipiell schon ausreichend ist, um die Motilität der Zellen zu verringern, wurde eine *lon*::Tn*10* Mutation (70), die zu starker Schleimbildung führt, in den Stamm MA1008 transduziert. Der vergleichende Schwärmtest mit dem Wildtypstamm MA1008, der *mdoA* Mutante TA1009 und der *lon* Mutante MA27-1 zeigt, daß die *lon* Mutation die Ausbildung von Chemotaxisringen nicht verhindert (Abb. 6).

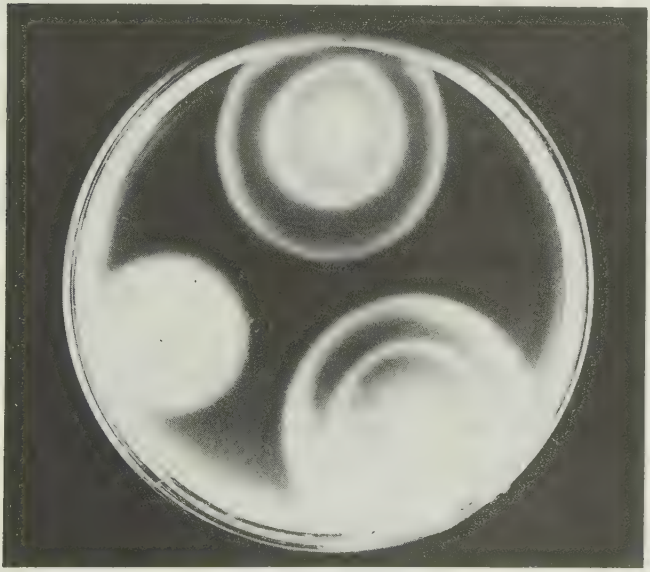


Abb. 6: Chemotaxistest

Zellen wurden über Nacht in TY-Medium gezüchtet, auf Trypton-Schwärmplatten aufgetropft und bis zur Ausbildung von Schwärmringen bei 27°C inkubiert. Anordnung: oben: MA1008, links: TA1009, rechts: MA27-1

3.2.4. Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin

Das Antibiotikum Bacitracin hemmt die Regeneration des Undecaprenylphosphat-Carriers, der zum Transport von Exopolysacchariden, Lipopolysaccharid und Murein durch die Cytoplasmamembran benötigt wird (86). Wenn die MDO-Ausschleusung ebenfalls über diesen Carrier stattfände, sollten Zellen, die kein MDO produzieren, d.h. weniger Carrier benötigen, besser in Anwesenheit von Bacitracin wachsen.

Um möglichst deutliche Effekte zu messen, wurde der Test in Medium sehr niedriger Osmolarität (1/8 TY-Medium) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Parallelansatz in Medium höherer Osmolarität (TY-Medium) mitbearbeitet.

Tab. 2 zeigt, daß bei sehr niedriger Osmolarität und damit hohem MDO-Bedarf die Empfindlichkeit der *mdoA* Mutante gegenüber Bacitracin im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. In Medium höherer Osmolarität ist dieser Unterschied kaum zu sehen

Tab. 2: Bacitracin-Test

0,1 ml einer ÜN-Kultur in TY-Medium wurde in 3 ml 1/8 TY- (TY-) Weichagar auf 1/8 TY- (TY-) Platten ausplattiert. Auf den Weichagar wurden Filterrondellen aufgelegt, die mit 15 µl einer Bacitracinlösung (250 mg/ml) getränkt waren. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Stamm	Hemmhofdurchmesser [mm]	
	1/8 TY-Medium	TY-Medium
MA1008	16	14
TA1008	12	13
TA1009	13	13

3.2.5. Wachstum unter osmotischem Streß

Die Tatsache, daß die MDO-Synthese der Osmoregulation unterliegt (43), deutet auf eine Funktion der MDO`s bei der osmotischen Adaptation der Zelle hin.

Daher wurde das Wachstum der *mdoA* Mutanten TA1008 und TA1009 in Medium hoher und niedriger Osmolarität (0,5% Pepton-Medium ohne und mit Zusatz von 0,4 M NaCl) im Vergleich zum Wildtyp MA1008 beobachtet. Trotz der osmotisch extremen Bedingungen waren jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante erkennbar.

3.2.6. Sensitivität gegenüber Phagen

Sensitivitätstests gegenüber Phagen wurden als Tropftest auf TY-Platten mit den Phagen P1, λ, T4, T5, T2, K3, BF23, Tu1a und Tu1b durchgeführt. Dabei konnte keine vollständige Resistenz der Mutante TA1009 gegen einen der Phagen beobachtet werden. Gegenüber den Phagen P1 und λ war die Mutante TA1009 jedoch resistenter als der Wildtyp MA1008, d.h. im Tropftest ließen sich die Mutantenzellen nur mit unverdünntem Phagenlysat lysieren, während dies beim Wildtyp auch mit einem 1:100 verdünnten Phagenlysat noch möglich war.

3.3. Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp

3.3.1. Isolierung von Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp

Die bisherigen Transduktionsexperimente erlauben auf Grund der ungenügenden Anzahl der auf MDO getesteten Transduktanten keine eindeutige Aussage über den genetischen Zusammenhang der *mdoA* Mutation mit dem chemotaxisnegativen Schwärmphänotyp. Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß schon im *mdoA* Elternstamm T10GP, eine weitere Mutation vorliegt, die zum Ausfall der Chemotaxis führt und in der Regel mit *mdoA* cotransduziert wird.

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen MDO-Synthese und Schwärmverhalten wurden daher von den *mdoA* Mutanten TA1008 und TA1009 wie unter 2.5.3. beschrieben spontane Revertanten isoliert, die wieder normale Schwärmringe ausbilden.

Insgesamt konnten so von der *mdoA* Mutante TA1008 sieben und von der *mdoA* Mutante TA1009 acht Revertanten isoliert werden, die wieder in der Lage sind, normale Schwärmringe auszubilden (Abb. 7; S. 54).

3.3.2. MDO-Gehalt der Phänotyp-Revertanten

Der MDO-Gehalt aller Revertanten mit chemotaxispositivem Phänotyp wurde nach 2.6.1.-2.6.4. bestimmt. Die Einzelergebnisse dieser Bestimmung sind in Tab. 3 aufgeführt.

Von der *mdoA* Mutante TA1008 konnte eine Revertante isoliert werden, die wieder normale Mengen an MDO produziert. Die übrigen sechs von diesem Stamm abgeleiteten Revertanten enthalten kein MDO. Von der Mutante TA1009 konnten nur Revertanten isoliert werden, die kein

MDO enthalten. In Abb. 7 ist der Chemotaxis-Phänotyp der Revertanten TA1008/0, TA1008/1 und TA1009/1 im Vergleich zum Wildtyp MA1008 und zur *mdoA* Mutante TA1008 dargestellt.

Tab. 3: MDO-Gesamtbestimmung der Phänotyp-Revertanten

Zellen wurden bis zu einer OD von 0,5 bei 37°C in 0,5% Pepton-Medium gezüchtet. MDO wurden durch Extraktion mit 50% Ethanol gewonnen und durch anschließende Lipidextraktion nach Bligh-Dyer (7) gereinigt. Die Abtrennung niedermolekularer Substanzen wurde auf einer Biogel P6 Säule durchgeführt. Fraktionen, in denen nach der Aufarbeitung von Wildtypzellen MDO eluiert wird, wurden vereinigt und ihr Zuckergehalt mit der Anthron-Reaktion (82) bestimmt.

Stamm TA1008		Stamm TA1009	
Revertante	µg Glucose/ 10^9 Zellen	Revertante	µg Glucose/ 10^9 Zellen
MA1008	1,31		
TA1008	0,02	TA1009	0,05
TA1008/0	0,73	TA1009/1	0,15
		TA1009/3	0,08
TA1008/1	0,05	TA1009/5	0,09
TA1008/2	0,04	TA1009/6	0,09
TA1008/3	0,04	TA1009/8	0,05
TA1008/4	0,03	TA1009/9	0,15
TA1008/6	0,06	TA1009/10	0,08
TA1008/7	0,05	TA1009/11	0,09

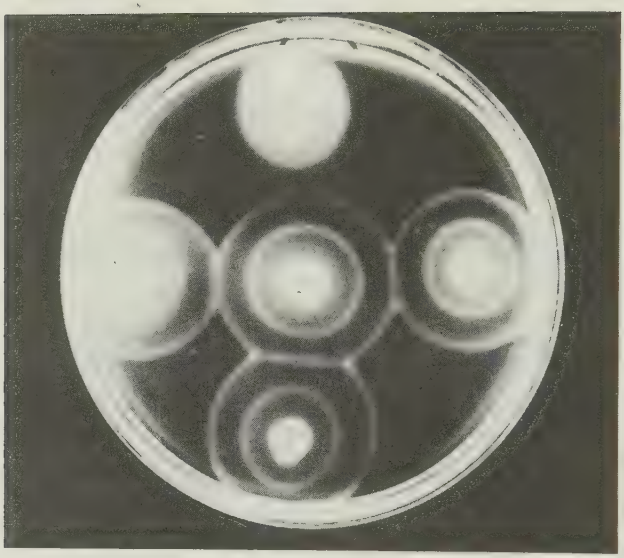


Abb. 7: Chemotaxistest der Phänotyp-Revertanten

Trypton-Schwärmplatten beimpft mit 1 Tropfen frisch gezüchteter Bakterienkultur nach 5-6 stündiger Inkubation bei 37°C. Anordnung: oben: TA1008, unten: TA1008/1, links: TA1009/1, rechts: TA1008/0, mitte: MA1008.

3.3.3. Phänotypische Eigenschaften der Revertanten

Da die Revertanten bis auf eine Ausnahme *mdoA* geblieben sind, wurden sie auch hinsichtlich der anderen phänotypischen Eigenschaften der *mdoA* Mutanten untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 4 (S. 57) dargestellt.

Die vom Stamm TA1008 abgeleitete Revertante TA1008/0, die wieder MDO produziert, verhält sich auch hinsichtlich der übrigen Eigenschaften wie der Wildtyp MA1008.

Die Revertanten, die weiterhin *mdoA* geblieben sind, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

Die vom Stamm TA1008 abgeleiteten Revertanten sind wie der Wildtyp MA1008 sensitiv gegenüber χ-Phagen und weisen im SDS-Polyacrylamidgel eine deutliche Flagellenbande auf. Sie unterscheiden sich vom Wildtyp aber dadurch, daß sie sowohl bei niedriger als auch bei hoher Osmolarität kein OmpC Protein in der äußeren Membran besitzen und daher resistent gegen Tu1b-Phagen sind (Abb. 8). Die vom Stamm TA1009 abgeleiteten Revertanten verhalten sich in Bezug auf die Porinexpression wie die *mdoA* Mutante TA1009, d.h. sie haben im Vergleich zum Wildtyp einen höhern Gehalt an OmpC-Protein in der äußeren Membran. Obwohl sie jedoch Flagellen besitzen, und die Flagellenbande im SDS-Polyacrylamidgel unverändert erscheint, bleiben sie resistent gegenüber χ-Phagen (Abb. 8).

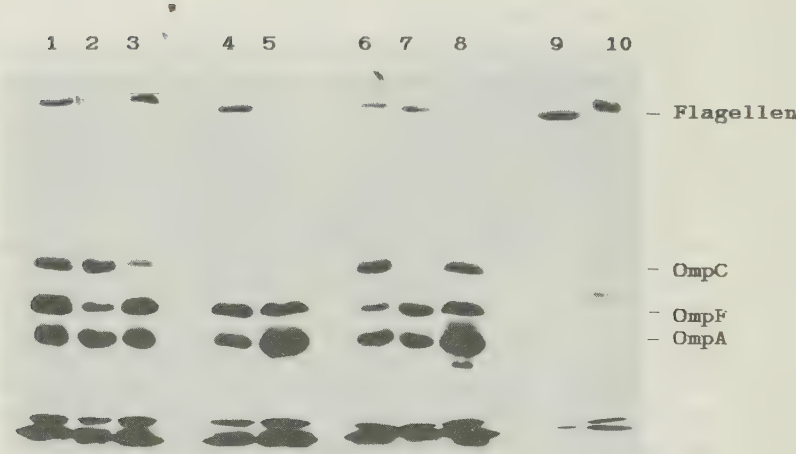


Abb. 8: Äußere Membranen der verschiedenen Revertantentypen

Die Zellen wurden in 5% Pepton-Medium gezüchtet. Äußere Membranen wurden nach der Schnellmethode von Hantke präpariert (34). Die Trennung der Membranproteine erfolgte mittels Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. 1: MA1008, 2: TA1009, 3: TA1008/0, 4:TA1008/1 -NaCl, 5: TA1008/1 +0,4M NaCl, 6: TA1009/1, 7: TA1009/1-1 -NaCl, 8: TA1009/1-1 +0,4M NaCl, 9: Flagellenpräparation vom Stamm MA1008 nach 2.10., 10: Proteinstandart: BSA (67 Kd), Ovalbumin (45 Kd), Carboanhydrase (29 Kd), Myoglobin (17,8 Kd)

Hinsichtlich der Schleimbildung und der Sensitivität gegenüber Bacitracin verhalten sich alle *mdoA* Revertanten gleich:

Eine auffällige Schleimabsonderung ist nicht mehr zu beobachten. Die Sensitivität gegenüber Bacitracin ist bei allen Revertanten bei niedriger Osmolarität stärker ausgeprägt als beim Wildtyp MA1008.

Eine zusammenfassende Darstellung der phänotypischen Eigenschaften aller Revertanten im Vergleich zum Wildtyp MA1008 und den *mdoA* Mutanten TA1008 und TA1009 ist in Tab. 4 gegeben.

Tab. 4: Phänotypische Eigenschaften der Revertanten

Die Flagellen- und Porinexpression wurde durch die Isolierung äußerer Membranen und anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophore nach 2.9. bestimmt Die Empfindlichkeit gegen χ-Phagen wurde nach 2.14.1. in Schwärmagar bestimmt.
Die Sensitivität gegenüber Bacitracin wurde mit Hilfe des Rondellentests nach 2.13. untersucht.
Die Schleimbildung wurde nach Wachstum bei 27°C auf M9-Platten mit Glucose als C-Quelle beurteilt.

Stamm	Flagellen	Porine	χ-Phagen	Bacitracin Hemmhof ½TY	TY	Schleim
MA1008	+	OmpC→	s	16	11	-
TA1008	-	OmpC↑	r	12	10	+
TA1009	-	OmpC↑	r	13	11	+
TA1008/0	+	OmpC→	s	15	11	-
TA1008/1	+	OmpC⁻	s	17	11	-
TA1008/2	+	OmpC⁻	s	19	11	-
TA1008/3	+	OmpC-	s	20	11	-
TA1008/4	+	OmpC-	s	19	13	-
TA1008/6	+	OmpC⁻	s	20	12	-
TA1008/7	+	OmpC-	s	20	12	-
TA1009/1	+	OmpC↑	r	19	11	-
TA1009/3	+	OmpC↑	r	18	11	-
TA1009/5	+	OmpC↑	r	18	11	-
TA1009/6	+	OmpC↑	r	19	10	-
TA1009/8	+	OmpC↑	r	19	11	-
TA1009/9	+	OmpC↑	r	19	10	-
TA1009/10	+	OmpC↑	r	19	11	-
TA1009/11	+	OmpC↑	r	19	11	-

Bezeichnungen: +/- : vorhanden/nicht vorhanden
s/r : sensitiv/resistent
↑/→ : mehr OmpC/Wildtyp-OmpC-Gehalt

3.3.4. Kartierung der Revertanten

3.3.4.1. Revertante TA1008/0

Da diese Revertante wieder normale Mengen an MDO produziert, lag die Vermutung nahe, daß es sich um eine echte *mdoA*$^+$ Revertante handelt. Um dies nachzuweisen, wurde eine P1-Transduktion mit einem Lysat der Revertante TA1008/0 in die *mdoA* Mutante TA1009 unter Selektion auf Wachstum ohne Uracil(*pyrC*$^+$) durchgeführt. Wenn die Reversion im *mdoA Gen* kartiert, sollten ca. 75% der *pyrC*$^+$ Transduktanten wieder den chemotaxispositiven Phänotyp zeigen (9). Tatsächlich war dies bei 70% von insgesamt 30 getesten Transduktanten der Fall. Zwei dieser Transduktanten wurden auf ihren MDO-Gehalt hin überprüft. Sie besaßen beide normale Mengen an MDO. Diese Ergebnisse zeigen, daß beim Stamm TA1008/0 eine Reversion zu *mdoA*$^+$ vorliegt.

3.3.4.2. Suppressormutanten TA1008/1 bis TA1008/7

Bei dieser Gruppe von Revertanten wurden die Versuche zur Kartierung exemplarisch mit der Revertante TA1008/1 durchgeführt.

Obwohl dieser Revertantentyp kein MDO besitzt, sollte zunächst überprüft werden, ob der chemotaxispositive Phänotyp mit *pyrC* cotransduzierbar ist. Zu diesem Zweck wurde ein P1-Lysat der Revertante TA1008/1 hergestellt, und eine Transduktion in die *mdoA* Mutante TA1009 unter Selektion auf *pyrC*$^+$ vorgenommen. Keine dieser Transduktanten (getestet 30) zeigte den chemotaxispositiven Phänotyp der Revertante, d.h. es muß sich um eine Suppressormutantion handeln, die an anderer Stelle auf dem *E. coli* Chromosom kartiert.

Der bei dieser Revertantengruppe auftretende OmpC⁻-Phänotyp weist darauf hin, daß die Suppressormutation im *ompB* Operon oder im *ompC* Gen kartieren könnte. Da die Transduktion der *ompC*::Tn*5* Mutation aus dem Stamm KB5 in die *mdoA* Mutante TA1008 den chemotaxispositiven Phänotyp nicht wiederherstellt, lag die Vermutung nahe, daß eine Mutation im *ompB* Operon vorliegt. Wäre dies der Fall, so müßte die Suppressormutation mit *aroB* und *malA* cotransduzierbar sein.

Um dies nachzuweisen wurde ein P1-Lysat der Revertante TA1008/1 hergestellt, und eine Transduktion in den Stamm AB2847 (*aroB, malA*) unter Selektion auf *aroB*⁺ durchgeführt. 45 *aroB*⁺ Transduktanten wurden im Querstrichtest auf TY-Platten auf Sensitivität gegenüber dem Phagen Tu1b getestet. 27 dieser Transduktanten erwiesen sich als resistent, d.h. die Cotransduktionfrequenz zwischen *aroB* und dem für den OmpC⁻-Phänotyp der Revertante verantwortlichen Gen beträgt 60%. Ein zusätzlich durchgeführter Querstrichtest mit dem Phagen Tu1a ergab jedoch, das 25 der Tu1b-resistenten Transduktanten auch Tu1a-resistent waren. (Tab. 5; S. 62). Diese Resistenz war aber nur auf TY-Platten zu beobachten, auf TY-Platten ohne Zusatz von NaCl waren sämtliche Transduktanten Tu1a-sensitiv. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die betreffenden Transduktanten nicht nur kein OmpC-Protein mehr besitzen, sondern auch die Menge an OmpF-Protein reduziert ist.

Um festzustellen auf welcher Seite von *aroB* die für den OmpC⁻-Phänotyp verantwortliche Mutation kartiert, wurden die Transduktanten auf die Übertragung des *malA* Gens getestet. Der Test auf Maltoseverwertung ergab, das 44% der Transduktanten auch das *malA*⁺ Gen der Revertante erhalten hatten. Theoretisch sollten alle (wenigstens der größte Teil) der *aroB*⁺ *malA*⁺ Transduktanten das zwischen *aroB* und *malA* liegende DNA-Stück mit dem *ompB* Genbereich der Revertante auch erhalten haben, d.h. sie sollten den OmpC⁻-Phänotyp der Revertante zeigen. Dies

war nur bei 50% der *aroB*$^+$ *malA*$^+$ Transduktanten der Fall (Tab. 5). Obwohl dieser Wert unter dem erwarteten liegt, kann angenommen werden, daß das Gen, das den OmpC$^-$-Phänotyp hervorruft, zwischen *aroB malA* liegt. Läge das Gen auf der anderen Seite von *aroB*, so wäre eine wesentlich geringere Kopplung von nur 16% zwischen *malA* und OmpC$^-$-Phänotyp zu erwarten. Eine zusammenfassende Darstellung der mit dem Stamm AB2847 ermittelten Cotransduktionsdaten ist in Abb. 10 (S. 66) gegeben.

Da der Stamm AB2847 nicht beweglich ist, war es in diesem Stammhintergrund nicht möglich, die Transduktanten auf Wiederherstellung der Chemotaxis zu testen. Hierzu war es notwendig, die *mdoA* Mutante TA1008 als Rezipient zu verwenden.

Um auch in diesem Fall eine Selektion auf *aroB*$^+$ zu ermöglichen, mußte zunächst das genetische Merkmal *aroB* in den Stamm TA1008 eingeführt werden. Dies war mit einem P1-Lysat des Stammes WF2848, der das Transposon *zhe5*::Tn*10* (Kartierung siehe Abb. 10) trägt, realisierbar. Eine *aroB* Transduktante, die auf den Erhalt des *mdoA* Phänotyps überprüft worden war (TA2847), wurde als Rezipient für die folgende Transduktion verwendet. Diese wurde analog zur Transduktion in den Stamm AB2847 mit einem P1-Lysat der Revertante TA1008/1 unter Selektion auf *aroB*$^+$ durchgeführt. Die Transduktanten wurden anschließend auf ihren OmpC$^-$-und ihren Chemotaxisphänotyp hin überprüft.

Der Querstrichtest mit Tu1b- und Tu1a-Phagen auf TY-Platten ergab folgendes Bild: 9 von insgesamt 15 *aroB*$^+$ Transduktanten waren resistent gegen den Phagen Tu1b, was einer Cotransduktionsfrequenz von 60% zwischen *aroB* und der für den ompC$^-$-Phänotyp verantwortlichen Mutation entspricht. 8 dieser Transduktanten waren jedoch außerdem resistent gegen den Phagen Tu1a (Tab.5; S. 62). Diese Resistenz war auf TY-Platten ohne NaCl-Zusatz nicht mehr zu beobachten.

Um die Porinmenge der Transduktanten genauer zu ana-

lysieren, wurden 10 Transduktanten nach Anzucht bei niedriger Osmolarität gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 9: S. 63). Dabei zeigte sich, daß 5 Transduktanten Porine wie die *mdoA* Mutante bildeten und 5 OmpC$^-$ geworden waren. 4 dieser OmpC$^-$-Transduktanten besaßen zudem auch weniger OmpF-Protein als der Donorstamm TA1008/1. Besonders auffällig war eine Transduktante mit extrem wenig OmpF-Protein, bei der eine zusätzliche Proteinbande auftrat. Da diese Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen den Porinen und der Flagellenbande auftritt, könnte man annehmen, daß es sich um LamB (50 Kd) handelt.

Die überprüfung des Chemotaxisverhaltens ergab, daß nur eine Transduktante wieder chemotaxispositiv geworden war. Es handelt sich dabei um die Transduktante, die OmpC$^-$ geworden ist, deren OmpF-Gehalt aber nicht reduziert ist. Eine MDO-Isolierung aus dieser Transduktante nach 2.6.1.-2.6.4. ergab, daß sie kein MDO produziert.

Tab. 5: Zusammenstellung der Transduktionsdaten zur Kartierung der Revertanten mit OmpC⁻-Phänotyp:

Transduktion	*aroB*⁺	OmpF⁺ OmpC⁻	OmpF↓ OmpC⁻	*malA*⁺	*malA*⁺ OmpC⁻	Chem. pos.
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
P1: TA1008/1 Rez: AB2847	45	2	25	20	10	-
P1: TA1008/1 Rez: TA2847	15	1	8	-	-	1
P1: TA1009/1-1 Rez: AB2847	25	0	16	9	6	-
P1: TA1009/1-1 Rez: TA2847	20	0	11	-	-	0

\- : nicht testbar
OmpF↓ : OmpF-Menge reduziert
Chem. pos. : Chemotaxispositiver Phänotyp

a) Gesamtzahl der *aroB*⁺ Transduktanten
b) Zahl der Transduktanten, die auf TY-Platten Tu1b^r und Tu1a^s waren
c) Zahl der Transduktanten, die auf TY-Platten TU1b^r und Tu1a^r waren
d) Zahl der Transduktanten, die Maltose verwerten konnten
e) Zahl der Transduktanten, die Maltose verwerten konnten und Tu1b^r waren
f) Zahl der Transduktanten mit chemotaxispositivem Phänotyp

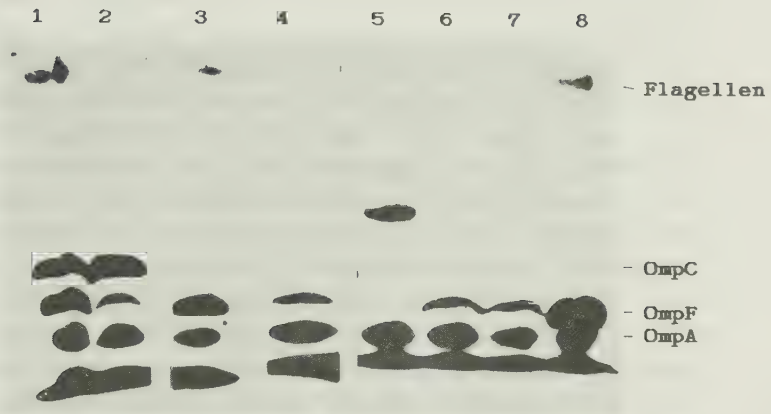


Abb. 9: Äußere Membranen von OmpC⁻-Transduktanten

Zellen wurden in 0,5% Pepton-Medium gezüchtet. Äußere Membranen wurden nach der Schellmethode von Hantke (34) präpariert. Die Trennung der Membranptoteine erfolgte mittels Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.
1: MA1008, 2: TA2847, 3: TA1008/1, 4-8: Tu1b-resistente Transduktanten Nr.1-5

Ein zweiter gedanklicher Ansatz zur Kartierung der in der Revertante TA1008/1 vorliegenden Suppressormutation beruhte darauf, die im *ompB* Genbereich vermutete Mutation durch den entsprechenden Wildtyp-Genbereich zu ersetzen, um so den Mutantenphänotyp wieder herzustellen.

Zu diesem Zweck wurde ein P1-Lysat des Stammes WF2847, der das Transposon *zhe4*::Tn*10* (Kartierung siehe Abb. 10, S. 66) trägt, hergestellt und zur Transduktion in die Revertante TA1008/1 verwendet. Tetracyclinresistente Transduktanten wurden auf *aroB*, auf das Vorhandensein von OmpC-Protein (Querstrichtest gegen Tu1b-Phagen auf TY-Platten) und auf ihren Chemotaxisphänotyp getestet. Unmittelbar nach der Transduktion waren 76% der Transduktanten (Gesamtzahl 85) aroB, 59% OmpC⁺ und 37% zeigten einen chemotaxisnegativen Phänotyp. Die sich aus

diesen Daten ergebende Lage der für den OmpC⁻-Phänotyp verantwortlichen Mutation ist in Abb. 10 (S. 66) dargestellt. Eine Korrelation zwischen dem Verlust des chemotaxispositiven Phänotyps und dem Auftreten des OmpC-Proteins war jedoch nicht nachweisbar. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, daß beide Phänotypen nicht stabil waren. Der Anteil von Transduktanten mit chemotaxisnegativem Phänotyp sank schon nach dem ersten Ausstrich auf 24%, nach weiteren 2 Ausstrichen waren keine mehr vorhanden. Der Anteil von OmpC⁺ Transduktanten betrug nach 3 Ausstrichen noch 24%. Um zu überprüfen, ob bei einer Transduktion mit dem hier verwendeten P1-Lysat generell Transduktanten mit chemotaxisnegativem Phänotyp auftreten, wurde eine Kontrolltransduktion in den Stamm MA1008 vorgenommen. In diesem Fall konnten auch unmittelbar nach der Transduktion nur chemotaxispositive Transduktanten gefunden werden (getestet 70).

3.3.4.3. Suppressormutanten TA1009/1 bis TA1009/11

Auch bei diesem Revertantentyp wurde die Kartierung exemplarisch mit der Revertante TA1009/1 durchgeführt. Wie bei der Phänotyp-Revertante TA1008/1 wurde zunächst überprüft, ob der chemotaxispositive Phänotyp mit *pyrC* cotransduzierbar ist. Die Tatsache, daß die vom Stamm TA1009 abgeleiteten Revertanten *pyrC* sind, machte folgenden Transduktionsansatz notwendig: Mit einem P1-Lysat der *mdoA* Mutante TA1008 wurde eine Transduktion in die Revertante TA1009/1 unter Selektion auf *pyrC*⁺ durchgeführt. Sollte die für den chemotaxispositiven Phänotyp verantwortliche Mutation im *pyrC* Genbereich kartieren, so wären Transduktanten zu erwarten, die wieder den chemotaxisnegativen Phänotyp zeigen. Da im Donor- und im Rezipientenstamm die gleiche *mdoA* Mutation vorliegt, wird gleichzeitig vermieden, daß durch Rekombination *mdoA*⁺ Transduktanten entstehen.

35 der so gewonnenen *pyrC*$^+$ Transduktanten wurden nach 2.14.1. auf Trypton-Schwärmplatten ohne und mit χ-Phagen getestet. Alle Transduktanten zeigten weiterhin den chemotaxispositiven Phänotyp, 29% waren jedoch sensitiv gegenüber χ-Phagen geworden.

Da damit bei 29% der Transduktanten der chemotaxispositive Phänotyp zwar erhalten blieb, die diesen Revertantentyp auszeichnende Eigenschaft der χ-Resistenz aber verloren ging, wurden alle Transduktanten im Querstrichtest gegenüber Tu1b-Phagen auf ihren OmpC-Phänotyp hin überprüft. Dabei ergab sich, daß alle Transduktanten, die χ-sensitiv geworden waren, phänotypisch OmpC$^-$ waren, d.h. sie zeigen den bei den Suppressormutanten TA1008/1-TA1008/7 beobachteten Phänotyp. Im Gegensatz zur Suppressormutante TA1008/1 ist in der äußeren Membran der χ^s, OmpC$^-$-Transduktante TA1009/1-1 bei hoher Osmolarität jedoch wieder OmpC-Protein vorhanden (Abb. 8, S. 56).

Um zu überprüfen, ob bei dem Suppressormutantentyp mit "sekundär" entstandenem OmpC$^-$-Phänotyp ebenfalls eine Mutation im *ompB* Genbereich vorliegt, wurden exemplarisch mit einem P1-Lysat des Stammes TA1009/1-1 (χ^s, OmpC$^-$) Transduktionen in die Stämme AB2847 und TA2847 unter Selektion auf *aroB*$^+$ durchgeführt.

Die Auswertung der Transduktion in den Stamm AB2847 ergab folgendes: 64% (getestet 25) der *aroB*$^+$ Transduktanten waren im Querstrichtest auf TY-Platten resistent gegen Tu1a- und Tu1b-Phagen. Auf TY-Platten ohne NaCl-Zusatz war die Resistenz gegen Tu1a-Phagen nicht mehr zu beobachten (Tab. 5; S. 62). 36% der *aroB*$^+$ Tranduktanten waren *malA*$^+$. Die Kopplung zwischen *malA*$^+$ und OmpC$^-$-Phänotyp betrug 67% (Tab. 5). Die aus diesen Ergebnissen abgeleiteten Genabstände sind zusammen mit den unter 3.3.4.2. beschriebenen Daten in Abb. 10 dargestellt.

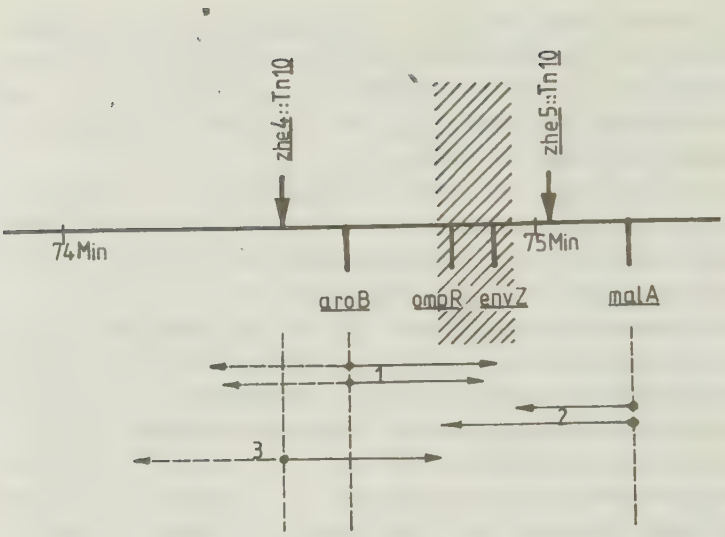


Abb. 10: Kartierung des OmpC⁻-Phänotyps der Suppressor-Mutanten mit chemotaxispositivem Phänotyp

Alle Genabstände wurden nach der Formel von Wu (97) berechnet.
Die Kartierung der Tn*10* Transposons erfolgte auf Grund folgender Cotransduktionsfrequenzen:
zhe4::Tn*10*-*aroB*: 76% (d=0,17 Min.),
zhe4::Tn10-*malA*: 28% (d=0,69 Min.)
zhe5::Tn*10*-*aroB*: 34% (d=0,60 Min.)
zhe5::Tn*10*-*malA*: 68% (d=0,24 Min.
Die Pfeile sind in der Mitte des Bereichs eingezeichnet, der sich auf Grund der Cotransduktionswerte als Integrationsbereich der Transposons ergibt.
1) Cotransduktion *aroB*⁺-*OmpC*⁻:
   60%→d=0,31 Min. (TA1008/1) bzw.
   64%→d=0,28 Min. (TA1009/1-1)
2) Cotransduktion *malA*⁺-*OmpC*⁻ nach Selektion auf *aroB*⁺:
   50%→d=0,41 Min. (TA1008/1) bzw.
   67%→d=0,25 Min. (TA1009/1-1)
3) Cotransduktion *zhe4*::Tn*10*-OmpC⁻:
   59%→d=0,32 Min. (TA1008/1)
Der schraffierte Bereiche gibt die mögliche Lage der für den OmpC⁻-Phänotyp verantwortlichen Mutation an. Läge die für den OmpC⁻-Phänotyp verantwortliche Mutation auf der anderen Seite von *aroB* (unterbrochene Pfeile), so wären geringere Kopplungsraten von 9% [3] bzw. 16% [1] zwischen *aroB* und OmpC⁻-Phänotyp zu erwarten.

Die Transduktion in den Stamm TA2847 lieferte folgendes Ergebnis: 55% (getestet 20) der *aroB*$^+$ Transduktanten waren im Querstrichtest auf TY-Platten resistent gegenüber Tu1a- und Tu1b-Phagen. Auf TY-Platten ohne NaCl-Zusatz waren alle Transduktanten Tu1a-sensitiv (Tab. 5; S. 62). Alle Transduktanten zeigten einen chemotaxisnegativen oder nicht motilen Phänotyp.

3.3.4.4. Einführung der *ompR2* Mutation in die *mdoA* Mutante TA1008

OmpR2 Mutanten zeigen wie die chemotaxispositiven Suppressormutanten TA1008/1 und TA1009/1-1 einen OmpC$^-$-Phänotyp (59). Daher sollte getestet werden, ob die Einführung der *ompR2* Mutation in die *mdoA* Mutante TA1008 die Chemotaxis wiederherstellt.

Zu diesem Zweck wurde ein P1-Lysat des Stammes WF2847 *zhe4*::Tn*10* hergestellt und eine Transduktion in den Stamm FN103 *ompR2* unter Selektion auf Tetracyclin-Resistenz ausgeführt. Von einer tetracyclinresistenten Transduktante, die im Querstrichtest gegen den Phagen Tu1b resistent war, wurde ein zweites P1-Lysat hergestellt und eine Transduktion in den Stamm TA1008 durchgeführt. Tetracyclinresistente Transduktanten wurden im Querstrichtest gegen Tu1b-Phagen getestet und auf ihren Chemotaxis-Phänotyp untersucht.

54% der Transduktanten (getestet 24) waren resistent gegen den Phagen Tu1b. Sie zeigten jedoch wie die Tu1b-sensitiven Transduktanten weiterhin den chemotaxisnegativen Phänotyp der *mdoA* Mutante.

3.4. Isolierung einer *mdoB* Mutante

Um nicht nur phänotypische Auswirkungen eines totalen MDO-Verlusts, sondern auch Auswirkungen des Verlusts negativ geladener Substituenten untersuchen zu können, wurde die nach Ref. (23, 72) isolierte Mutante WF21-1 in die Untersuchungen einbezogen.
Das Prinzip der dort angewandeten Mutanten-Isolierung beruht auf dem selektiven Einbau von 2-^{3}H-Glycerin in Lipide und glycerinhaltige Lipidabkömmlinge wie Lipoprotein und MDO (30). Bei der Einschleusung in den Energiestoffwechsel geht dagegen die radioaktive Markierung am C-2 Atom des Glycerins verloren (33). Mit Hilfe dieser Markierung konnten daher mittels Kolonie-Autoradiographie Mutationen gesucht werden, die den Glycerineinbau in die oben genannten Zellbestandteile reduzieren. Die vorliegende *mdoB* Mutante WF21-1 war in einem Kolonieautoradiographie-Selektionsverfahren aufgefallen, das den Einbau von 2-^{3}H-Glycerin in Lipoprotein, MDO, ECA und Kapselsubstanzen erfaßt, und wurde daraufhin hinsichtlich des Glycerineinbaus in MDO untersucht. Diese Untersuchung ergab, daß die Mutante kein 2-^{3}H-Glycerin in MDO einbaut, obwohl sie normale Mengen an MDO-Zuckern enthält (23, 72).

3.5. Kartierung der *mdoB::*Tn*10* Mutation

Da es sich bei der isolierten *mdoB* Mutation um eine Tn*10* Insertion handelt (23, 72), konnte die Kartierung mit Hilfe der Tetracyclinresistenz des Transposons durchgeführt werden.

Konjugationsexperimente mit verschiedenen Hfr-Stämmen ergaben, daß das Transposon zwischen den Hfr-Origins von HfrH und HfrR5, also zwischen 97 und 3 Min. inte-

griert sein muß (23). Auf Grund dieser groben Eingrenzung des Integrationsortes wurden Cotransduktionsexperimente mit verschiedenen Genen in diesem Bereich durchgeführt.

Abb. 11 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der ermittelten Cotransduktionsdaten (24). Nur drei der getesteten Gene, nämlich *carB*, *thr* und *deoB* waren zu 2,5%, 22,6% und 47,9% mit *mdoB*::Tn*10* cotransduzierbar (Tab. 6). Aus diesen Cotransduktionsfrequenzen kann im Bereich von 99 Min. folgende Genreihenfolge abgeleitet werden: *dnaC*, *mdoB* (99,2 Min.), *rimI*, *deoB*. Die Abstände zwischen der *mdoB*::Tn*10* Mutation und den mit ihr cotransduzierbaren Genen wurde nach der Formel von Wu (97) berechnet. Die genaue Lage der *mdoB*::Tn*10* Mutation in Bezug auf *tsr* kann an Hand der ermittelten Cotransduktionsfrequenzen nicht festgelegt werden.

Tab. 6: Bestimmung von Cotransduktionsfrequenzen

P1-Transduktionen wurden mit P1-Lysaten der ursprünglich isolierten Mutante WF21-1 durchgeführt. Tetracyclinresistente Transduktanten wurden auf ihre Fähigkeit, ohne den Zusatz von Leucin, Threonin bzw. Uracil und Arginin (*carB*) wachsen zu können, bzw. Guanosin oder Adenosin verwerten zu können (*deoB*) getestet.

Donor	Rezipient	Getestetes Merkmal	Cotransduktions-frequenz
WF21-1	AB1157	*leu*$^+$	0%
WF21-1	AB1157	*thr*$^+$	22,6%
WF21-1	JEF8	*carB*$^+$	2,5%
WF21-1	GM18	*deoB*$^+$	47,9%

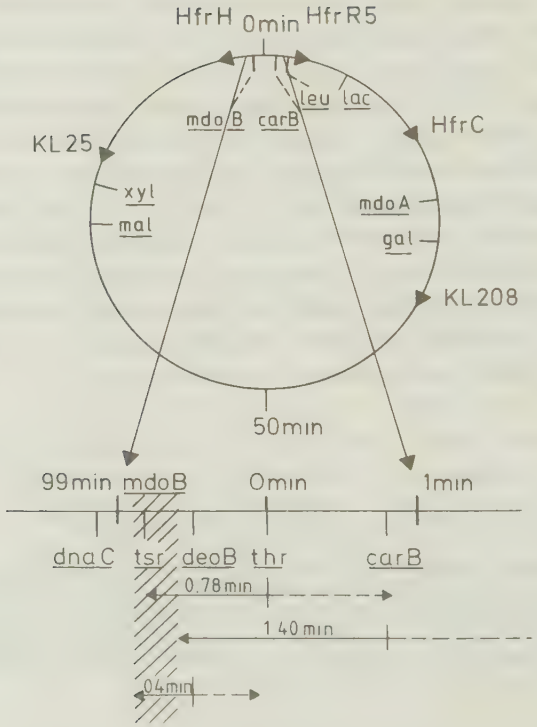


Abb. 11 (24) Kartierung der *mdoB*::Tn*10* Mutation

Mit Hilfe verschiedener Gene für Zuckerverwertung (*mal*, *xyl*, *lac*,*gal*) und verschiedener Hfr-Stämme wurde der Integrationsort des Transposons grob eingegrenzt. Die Feinkartierung wurde mit Hilfe von Cotransduktionsdaten ermittelt.
Eingezeichnet sind nur die für die Kartierung relevanten Gene. Die Pfeile geben Abstände zwischen der *mdoB*::*Tn10* Mutation und den Testgenen an, die nach der Formel von Wu (97) errechnet wurden.

3.6. Biochemische Charakterisierung einer *mdoB* Mutante

3.6.1. Vorraussetzungen für den *in vivo* Test der Phosphoglycerintransferase I-Aktivität

Das Fehlen von Glycerin-1-Phosphat im MDO der vorliegenden Mutante kann grundsätzlich zwei verschiedene Ursachen haben. Die erste denkbare Ursache ist ein Defekt in der übertragung des Glycerin-1-Phosphats von Phosphatidylglycerin auf MDO, die zweite eine nachträgliche enzymatische Abspaltung durch ein normalerweise inaktives Enzym. Um die in der Mutante WF21-1 vorliegende Ursache zu ermitteln, wurde die Aktivität der Phosphoglycerintransferse I im Wildtyp und der *mdoB* Mutante gemessen.

In *E.coli* gibt es zwei Enzyme, die an der übertragung des Glycerin-1-Phosphats auf MDO beteiligt sind:

- Die membrangebundene Phosphoglycerin-Transferase I katalysiert den Transfer des Glycerin-1-Phosphats vom Phosphatidylglycerin auf carriergebundenes, noch nicht substituiertes MDO (37).
- Die periplasmatische Phosphoglycerin-Transferase II katalysiert den Transfer des Glycerin-1-Phosphats von carriergebundenem, mit Glycerinphosphat substituiertem MDO auf freies, periplasmatisches MDO und sorgt so für die Mehrfachsubstitution mit Glycerin-1-Phosphat (29).

Arbutin kann als künstlicher Rezipient für die, durch die Phosphoglycerin-Transferase I katalysierte Transfer-Reaktion eingesetzt werden (37). Hierfür ist es nicht notwendig, die Zellen aufzuschließen, denn Arbutin kann auf Grund seiner geringen Größe ins Periplasma der Zelle diffundieren und damit an die Außenseite der Cytoplasmamembran gelangen, an der sich das aktive Zentrum der

Phosphoglycerin-Transferase befinden muß (10). Um ausschließen zu können, daß die hier stattfindende Übertragung von Glycerin-1-Phosphat auf Arbutin durch die Phosphoglycerin-Transferase II erfolgt, muß dafür gesorgt werden, daß der für dieses Enzym notwendige Glycerinphosphat-Donor, nämlich carriergebundenes MDO, in der Zelle nicht vorhanden ist.

Dies kann durch die Verwendung einer *pgi* oder einer *mdoA* Mutante erreicht werden. *pgi* Mutanten (93), denen die Phosphoglucose-Isomerase fehlt, können ohne Glucosezusatz zum Medium kein MDO synthetisieren (68). *mdoA* Mutanten fehlt das für die Synthese der MDO-Zuckerketten notwenige Glucosyltransferase-System (94).

Bohin und Kennedy haben auf dieser Grundlage ein *in vivo* Testsystem der Phosphoglycerin-Transferase I-Aktivität entwickelt, bei dem ganze, mit 2-^{3}H-Glycerin markierte Zellen die enzymatische Aktivität und den Glycerinphosphat-Donor Phosphatidylglycerin liefern, während ein künstlicher Glycerinphosphat-Rezipient (Arbutin) von außen zugegeben wird (10). Da bei dieser Transferreaktion die radioaktive Markierung des Glycerinphosphats auf Arbutin übertragen wird, ist es möglich, die Reaktion durch Isolierung des radioaktiven Arbutin-Phosphoglycerins aus dem Medium nachzuweisen.

Um die Spezifität dieses Tests zu gewährleisten, ist es wie oben schon erwähnt notwendig, einen *pgi* oder einen *mdoA* Stamm zu verwenden. Daher war es nicht möglich, die ursprünglich isolierte Mutante WF21-1 einzusetzen. Statt dessen wurden wurden *mdoB*::Tn*10* Transduktanten des Stammes DF214 (*pgi*) und des Stammes (T10GP) *mdoA* verwendet.

3.6.2. Nachweis der Phosphoglycerin-übertragung auf Arbutin *in vivo*

Für den *in vivo* Test der Phosphoglycerin-Transferase I-Aktivität wurden die Stämme DF214 *pgi*::Mu und WF214 *pgi*::Mu, *mdo*B::Tn*10* in niedrig osmolarem LOS-Medium (54), das 17 mM Arbutin und $3{,}7\times10^4$ Bq/ml 2-^{3}H-Glycerin enthielt, 24 Std. inkubiert. Nach der Entfernung der Zellen wurden Arbutin und seine Derivate durch Adsorption an Aktivkohle aus dem Medium entfernt und anschließend mit Pyridin wieder von der Aktivkohle eluiert. Das so gewonnene Material wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie auf einer DEAE-Cellulose-Säule getrennt.

Das Ergebnis dieser Chromatographie nach Aufarbeitung des Stammes DF214 ist in Abb. 12A dargestellt. Von der Säule werden zwei radioaktive Gipfel eluiert. Gipfel I enthält ^{3}H-markiertes Material unbekannten Ursprungs. Sein Auftreten ist unabhängig von der Arbutinzugabe zum Medium. Die Retentionszeit des Gipfels II deutet darauf hin, daß dieses erst bei relativ hoher Salzkonzentration eluierte Material negative Ladungen trägt.

Um das Vorhandensein von Glycerinphosphat nachzuweisen, wurde das in Gipfel II eluierte Material in 0,5 N NaOH hydrolysiert. Die markierten Hydrolyseprodukte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Referenzen dienten radioaktiv markiertes Glycerin und Glycerin-3-Phosphat. Die R_f-Werte in dem hier verwendeten Chromatographie-System betrugen 0,58 für Glycerin und 0,08 für Glycerin-3-Phosphat. Das nicht hydrolysierte Material aus Gipfel II bildet einen einzelnen Fleck mit einem R_f-Wert von 0,44, während das hydrolysierte Material einen R_f-Wert von 0,09 aufweist. Obwohl es mit dem hier verwendeten System nicht möglich ist, zwischen 1- und 3-Isomeren zu unterscheiden, weist dieses Ergebnis auf das Vorhandensein von Glycerinphosphat in der Probe hin.

Da nach der Aufarbeitung des Stammes WF214 der Gipfel

II völlig fehlt (Abb. 12A), kann angenommen werden, daß die *mdoB* Mutante nicht in der Lage ist, markiertes Glycerinphosphat auf Arbutin zu übertragen.

Das oben geschilderte Experiment wurde mit den Stämmen T10GP und F10GP *mdoB*::Tn*10* wiederholt. Auch in diesem Fall fehlt der arbutinabhängige Gipfel II nach der Aufarbeitung der *mdoB* Mutante, während er beim Stamm T10GP vorhanden ist. Hydrolyseversuche ergaben auch hier, daß es sich bei dem radioaktiven Material in Gipfel II um Phosphoglycerin handelt.

3.6.3. Chemische Identifizierung von Arbutin-Phospho-Glycerin

Um eine chemische Analyse des in Gipfel II (Abb. 12A) vorhandenen Materials durchführen zu können, wurden 200 ml-Kulturen der Stämme DF214 und WF214 ohne Zugabe von 2-^{3}H-Glycerin analog zum radioaktiven Ansatz aufgearbeitet. Nach der Entfernung der Zellen wurde ^{3}H-markiertes Material aus Gipfel II als interner Standard zu beiden Proben zugegeben. Die Aufarbeitung der Proben unterschied sich von der des radioaktiven Ansatzes durch eine zusätzlich durchgeführte Sephadex-G10 Säulenchromatographie, die zur Entfernung der großen Menge nicht modifizierten Arbutins nötig war. Bei dieser Chromatographie wurde das ^{3}H-markierte Material früher eluiert als das nicht modifizierte Arbutin, das mit Hilfe seiner UV-Absorption detektiert wurde. Die Fraktionen, die ^{3}H-markiertes Material enthielten, wurden vereinigt und über eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetrennt. Das radioaktive Material (ca. 20% der anfangs eingesetzten Radioaktivität) wurde in einem einzigen Gipfel eluiert, dessen Position der des Gipfel II aus dem vorigen Versuch entsprach.

Arbutin wurde chemisch durch zwei verschiedene Testreaktionen nachgewiesen. Der Hexoseanteil wurde mit Hil-

fe der Anthron-Reaktion bestimmt, während der Phenolanteil spektrophotometrisch auf Grund seiner spezifischen Absorptionsverschiebung detektiert wurde.

Abb. 12B zeigt das Ergebnis dieser Bestimmungen nach Aufarbeitung des Stammes DF214. Die Anthron-Reaktion liefert hier 2 Gipfel, deren Positionen denen der beiden Gipfel des radioaktiven Ansatzes (Abb. 12A) entsprechen. Die spektrophotometrische Messung des Phenolanteils von Arbutin ergibt nur einen Gipfel, der mit dem des ^{3}H-markierten Materials übereinstimmt. Arbutin ist demnach nur in dem zweiten mit der Anthron-Reaktion nachgewiesenen Gipfel enthalten. Im Gipfel II wurde damit ^{3}H-markiertes Glycerinphosphat sowie der Hexose- und der Phenolanteil von Arbutin nachgewiesen.

Abb. 12C zeigt das Ergebnis derselben Messungen nach Aufarbeitung des Stammes WF214. Auch in diesem Fall wurden ca. 20% des eingesetzten radioaktiven Materials im Bereich des Gipfels II (Abb 12A) wiedergefunden, während keinerlei anthronpositives oder spektrophotometrisch bestimmbares Material in diesem Bereich nachweisbar ist. Das anthronpositive Material des 1. Gipfels, das keine UV-Absorptionsverschiebung erzeugt, ist jedoch vorhanden.

Diese Ergebnisse weisen wieder darauf hin, daß die *mdoB* Mutante im Gegensatz zum *mdoB* Wildtyp nicht in der Lage ist, Glycerinphosphat auf Arbutin zu übertragen. Trotzdem kann auf Grund der bisher dargestellten Daten noch nicht ausgeschlossen werden, daß im Testansatz mit der *mdoB* Mutante Arbutin-Phosphoglycerin entsteht, das sofort wieder abgebaut wird.

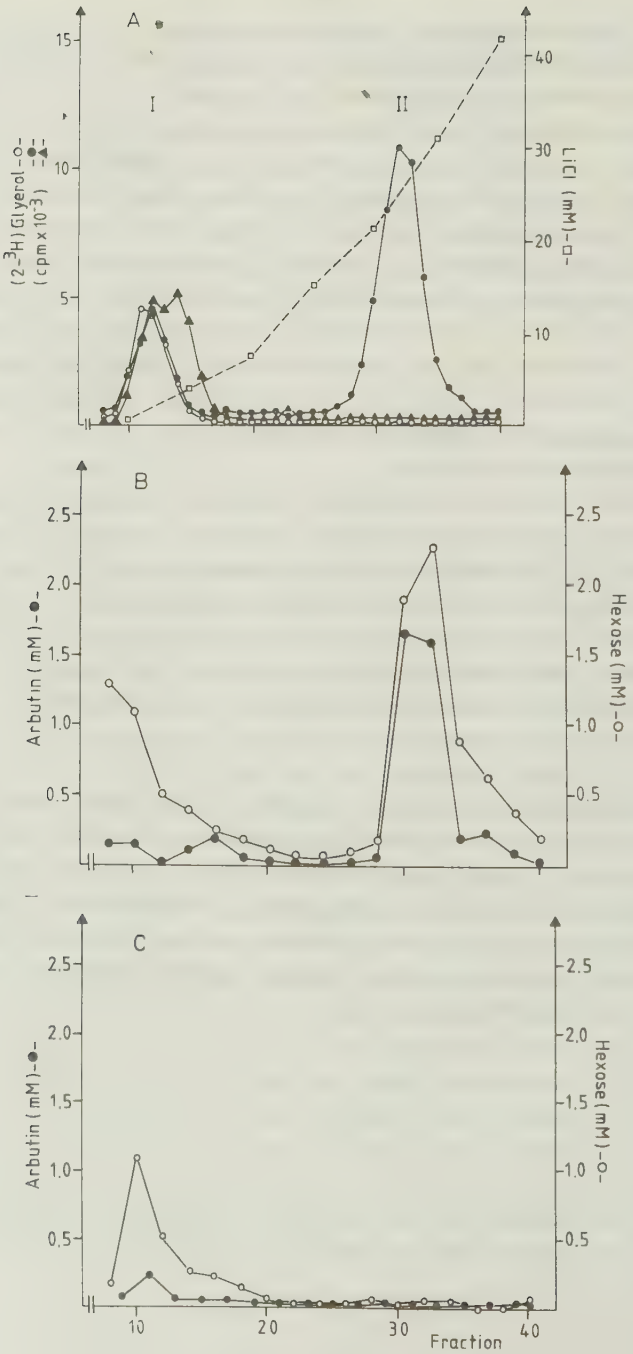

A
I
II
(2-^{3}H) Glycerol -o-
(cpm x 10^{-3}) -●-
-▲-
Li[ ] (mM) -□-
B
Arbutin (mM) -●-
Hexose (mM) -o-
C
Arbutin (mM) -●-
Hexose (mM) -o-
Fraction

Abb. 12 (24) *In vivo* Nachweis der Phosphoglycerin-Transferase I:

A) DEAE-Cellulose- Chromatographie von Kulturüberständen 2-^{3}H-markierter, mit Arbutin versetzter Kulturen der Stämme DF214 (●) und WF214 (○), sowie eines Kontrollansatzes mit dem Stamm DF214 ohne Arbutin (▲).
Zellen wurden in LOS-Medium mit 17mM Arbutin und $3,7 \times 10^{4}$ Bq/ml 2-^{3}H-Glycerin bis zur späten logarithmischen Phase gezüchtet. Nach Entfernung der Zellen wurden Arbutin und seine modifizierte Form durch Adsorption an Aktivkohle aus dem Medium extrahiert und anschließend mit 15% Pyridin wieder eluiert. Nach der Entfernung des Pyridins durch Lyophilisation wurde der Extrakt über eine DEAE-Cellulose Säule aufgetrennt, die mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,05 M LiCl eluiert wurde. Die LiCl-Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen wurden durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit bestimmt. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde im Scintillationszähler gemessen.

B) DEAE-Cellulose-Chromatographie von Arbutin-Phosphoglycerin, isoliert aus Kulturüberständen des Stammes DF214 nach Anzucht in 200 ml LOS-Medium mit 10 mM Arbutin. Die Aufarbeitung dieses Kulturüberstandes erfolgte im Prinzip wie unter A) beschrieben. Da diese Kultur nicht radioaktiv markiert war, wurde als interner Standard 2-^{3}H-markiertes Material aus Gipfel II von Versuch A) zugegeben. Vor die DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde eine Sephadex-G10 Chromatographie vorgeschaltet, um nichtmodifiziertes Arbutin zu entfernen. Nach dieser Chromatographie wurden 2-^{3}H-markierte Fraktionen vereinigt und wie unter A) beschrieben über eine DEAE-Cellulose- Säule aufgetrennt. In allen Fraktionen dieses Säulenlaufs wurden die Radioaktivität und der Arbutingehalt gemessen. Die Messung des Arbutingehalts wurde mit Hilfe der Anthron-Reaktion und der spezifischen UV-Absorptionsverschiebung wie in 2.8.2. beschrieben durchgeführt.

C) DEAE-Cellulose-Chromatographie wie unter B) beschrieben nach Aufarbeitung von Kulturüberständen der *mdoB* Mutante WF214.

3.6.4. Akkumulation von Diglycerid in *dgk mdoB* Doppelmutanten

Das beim Transfer des Glycerin-I-Phosphats vom Phosphatidylglycerin auf MDO anfallende Diglycerid wird über die Glycerin-Kinase-Reaktion wieder in den Lipidstoffwechsel eingeschleust (66). Mutanten, denen die Diglycerid-Kinase fehlt (*dgk*), akkumulieren das bei dieser Reaktion entstehende Diglycerid (68). Daher ist es möglich, über die Messung des Diglycerid-Gehalts festzustellen, ob die in der Mutante WF21-1 vorhandene Mutation die Abspaltung des Glycerin-I-Phosphats von Phosphatidylglycerin verhindert. Ist dies der Fall, so sollte der Diglycerid-Gehalt der *dgk mdoB* Doppelmutante niedriger sein als der der *dgk* Mutante. Damit wäre gezeigt, daß in der *mdoB* Mutante WF21-1 tatsächlich die von der Phosphoglycerin-Transferase I katalysierte Transferreaktion des Glycerinphosphats vom Phosphatidylglycerin auf MDO ausgefallen ist. Bei einer nachträglichen Abspaltung des Glycerin-I-Phosphats von MDO wären keine Auswirkungen auf die Akkumulation von Diglycerid zu erwarten.

Um eine Diglycerid-Akkumulation messen zu können, war es zunächst notwendig, die *mdoB*::Tn*10* Mutation durch P1-Transduktion in den *dgk* Stamm RZ60 zu übertragen (WF60). Der Diglyceridgehalt beider Stämme (RZ60 / WF60) wurde durch Markierung der Lipide mit ^{14}-C-Acetat und anschließende chromatographische Auftrennung der neutralen Lipide nach 2.7.2. bestimmt. Um die Diglycerid-Akkumulation auch unter den Verhältnissen des *in vivo* Tests der Phosphoglycerin-Transferase I, d.h. mit künstlichem Glycerinphosphat-Akzeptor, messen zu können, wurden die Versuche unter Zugabe von 17 mM Arbutin zum Medium wiederholt.

Tab. 7 zeigt die Ergebnisse dieser Diglycerid- Bestimmung in Medium niedriger und hoher Osmolarität ohne und mit zusätzlicher Arbutinzugabe. Die Einführung der *mdoB*

Mutation in den Stamm RZ60 reduziert den Diglycerid-Gehalt zwar, jedoch nicht so stark wie die Repression der MDO-Synthese bei hoher Osmolarität. Zudem ist auch beim Stamm WF60 *mdoB* eine mit der Erhöhung der Osmolarität einhergehende Reduktion des Diglycerid-Gehalts zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß neben der Phosphoglycerin-Transfer-Reaktion noch eine weitere osmotisch regulierte Diglycerid liefernde Reaktion vorhanden sein muß.

Die Zugabe des künstlichen Phosphoglycerin-Akzeptors Arbutin erhöht die Diglyceridakkumulation im Stamm RZ60 bei niedriger und hoher Osmolarität drastisch, da das Vorhandensein von MDO als Phosphoglycerinakzeptor bei Arbutinzugabe kaum eine Rolle spielt. Im Stamm WF60 ist dagegen nur eine schwache Erhöhung der Diglycerid-Akkumulation festzustellen. Der Effekt der *mdoB* Mutation ist damit nach Arbutin-Zugabe noch deutlicher sichtbar als ohne Arbutin. Die Tatsache, daß überhaupt eine gewisse Erhöhung des Diglycerid-Gehalts eintritt, deutet wieder darauf hin, daß es neben dem Phosphoglycerin-Transfer noch eine andere Diglycerid liefernde Reaktion geben muß.

Insgesamt bleibt festzustellen, daß die Einführung der *mdoB::*Tn*10* Mutation die Diglycerid-Akkumulation in *dgk* Stämmen deutlich reduziert. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, daß eine weitere osmotisch regulierte Diglycerid liefernde Reaktion vorhanden sein muß. Es ist in diesem Zusammenhang interessant zu erwähnen, daß die *mdoB* Mutanten WF21-1 und WF16 im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp einen höheren Phosphoethanolamin-Gehalt des MDO aufweisen (3.7.).

Tab. 7 (24) Diglycerid-Bestimmung

Zellen wurden in 0,5% Pepton-Medium mit 0,05M NaCl und $18,5 \times 10^4$ Bq 1-^{14}C-Acetat gezüchtet. Die Osmolarität wurde durch Zugabe von 0,4 M NaCl erhöht. Arbutin wurde in einer Kozemtration von 17 mM zugegeben. Phospholipide und neutrale Lipide wurden nach Bligh-Dyer extrahiert und dünnschichtchromatographisch in einem System zur Trennung neutraler Lipide aufgetrennt. Die angegebenen Werte stellen den prozentualen Anteil der 1,2- und 1,3-Diglycerid-Radioaktivität an der Gesamtlipid-Radioaktivität dar.

Stamm	Prozentualer Anteil von DG am Gesamtlipid			
	-Arbutin		+Arbutin	
	-NaCl	+NaCl	-NaCl	+NaCl
RZ60	6,6	4,0	11,3	15,4
WF60	4,9	2,5	6,1	3,3

3.7. Bestimmung der MDO-Substituenten

Wie schon früher gezeigt wurde (76, 92), ist Glucose der einzige in MDO-Molekülen nachweisbare Zucker. Bestimmungen der Molekülgröße von MDO lieferten einen durchschnittlichen Wert von 10 Glucose-Einheiten pro MDO-Molekül (76). Diese Molekülgröße scheint auch in der *mdoB* Mutante WF21-1 vorzuliegen, da durch Biogel-P6-Säulenchromatographie keine Größenunterschiede zwischen Wildtyp- und Mutanten-MDO feststellbar sind (32, 72). Daher kann angenommen werden, daß in der *mdoB* Mutante die gleiche Anzahl freier OH-Gruppen an den C-6 Atomen der einzelnen Glucosemoleküle zur Substitution zur Verfügung steht.

Da angenommen wird, daß die negativen Ladungen von MDO bei der Osmoregulation eine wichtige Rolle spielen (54), sollte untersucht werden, ob der Verlust des negativ geladenen Glycerinphosphats in der *mdoB* Mutante durch den vermehrten Einbau des anderen negativ geladenen Substituenten Succinat kompensiert wird.

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse der nach 2.6.5. durchgeführten Substituenten-Analyse. MDO wurde zu diesem Zweck aus 20 l-Kulturen der *mdoB*-Mutanten WF21-1 und WF16 sowie aus 20 l-Kulturen der entsprechenden Wildtypstämme WR1 und KL16 isoliert und über Biogel-P6 gereinigt. Die Freisetzung der Substiuenten erfolgte durch alkalische bzw. saure Hydrolyse der MDO-Moleküle. Um eventuell auftretende Verluste bei der Hydrolyse und den nachfolgenden Aufarbeitungsschritten erfassen zu können, wurde zu jeder Probe vor der Hydrolyse 2-^{3}H-markiertes MDO als interner Standard zugegeben. 90% dieser Radioaktivität konnten in den Proben unmittelbar vor der Durchführung der Testreaktionen nachgewiesen werden.

Der bisher nur radiochemisch nachgewiesene Verlust des Glycerinphosphats in der *mdoB* Mutante (23, 72) konnte nun bei der ursprünglich isolierten Mutante WF21-1 und

der *mdoB*::Tn*10* Transduktante WF16 auch biochemisch mit Hilfe der Glycerin-Kinase-Reaktion nachgewiesen werden. Die Anzahl der Succinat-Substituenten, die mit der Succinyl-CoA-Synthetase-Reaktion gemessen wurden, ist im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp nicht signifikant verändert. Der Gehalt des neutralen Substituenten Phosphoethanolamin wurde mit Hilfe des Ethanolaminanteils durch Aminosäureanalyse bestimmt. Er ist bei den *mdoB* Mutanten WF21-1 und WF16 im Vergleich zum jeweiligen Wildtypstamm auf ca. den doppelten Wert erhöht.

Insgesamt muß aus diesen Daten geschlossen werden, daß der Verlust der negativen Ladungen des Glycerinphosphats nicht durch den vermehrten Einbau von Succinat ausgeglichen wird. Da der vermehrte Einbau von Phosphoethanolaminethanolamin keine zusätzlichen negativen Ladungen liefert, sollte tatsächlich ein Verlust negativer Ladungen vorliegen.

Tab. 8: MDO-Substituenten-Besimmung

MDO wurde aus 20 l Kulturen in 1% Pepton-Medium mit 50% Ethanol extrahiert und durch ein Lipidextraktion nach Bligh-Dyer (7) gereinigt. Zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen wurde eine Biogel P6-Säulenchromatographie durchgeführt. MDO enthaltende Fraktionen wurden eingeengt und entsalzt. Nach Zugabe von 2-^{3}H-Glycerin als internem Standard wurde die entsalzte MDO-Lösung einer alkalischen bzw. sauren Hydrolyse unterworfen. Anschließend wurden die einzelnen Testreaktionen wie unter 2.6.5. beschrieben durchgeführt. Die Berechnung der Substituentenzahl pro MDO-Molekül basiert auf der Annahme, daß 10 Glucose-Einheiten ein MDO-Molekül bilden.

Stamm	[a] MDO µmol Glucose	[b] Glycerin	[c] Ethanolamin µmol/µmol MDO	[d] Succinat
WR1	69,3	1,70	0,75	0,49
WF21-1	86,7	0,05	1,50	0,31
K116	66,7	1,07	0,77	0,49
WF16	52,4	0,03	1,21	0,54

[a]: MDO-Gehalt der Kultur
[b]: Mittelwert zweier Glycerinbestimmungen eines Hydrolyseansatzes (Abweichung ± 5%).
[c]: Bestimmt durch Aminosäureanalyse mit Norleucin als internem Standard
[d]: Mittelwert zweier Succinatbestimmungen eines Hydrolyseansatzes (Abweichung ± 2%)

3.8. Phänotypische Eigenschaften der *mdoB* Mutante

Die *mdoB* Mutante Wf21-1 bzw. deren Transduktanten wurden hinsichtlich der bei der *mdoA* Mutante gefundenen Phänotypen (3.2.) untersucht. Dabei konnte kein vom jeweiligen Wildtyp abweichender Phänotyp bei der *mdoB* Mutante festgestellt werden, d.h. Schwärmverhalten, Porinexpression und Bacitracin-Empfindlichkeit werden durch die *mdoB* Mutation nicht beeinflußt. Eine auffällige Schleimbildung ist ebenfalls nicht zu beobachten. Abb. 13 zeigt ein Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel der äußeren Membran

der Stämme RZ600, RZ1009 und WF600 *mdoB*::Tn*10*. Im Gegensatz zur *mdoA* Mutation führt die *mdoB* Mutation weder zu einer Reduktion der Flagellen noch zu einer verstärkten OmpC Expression bei niederer Osmolarität.

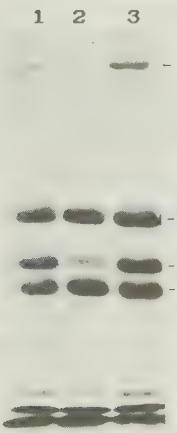


Abb. 13: Äußere Membran einer *mdoB* Mutante

Die Zellen wurden in 0,5% Pepton-Medium gezüchtet. Äußere Membranen wurden nach der Schnellmethode von Hantke (34) präpariert. Die Trennung der Membranproteine erfolgte mittels Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.
1: RZ600, 2: RZ1009, 3: WF600 *mdoB*::Tn*10*

Hinsichtlich des Wachstums unter extremen Osmolaritätsbedingungen wurde bei der *mdoB* Mutante wie schon bei der *mdoA* Mutante keine Beeinträchtigung festgestellt.

Der einzige vom entsprechenden Wildtyp abweichende Phänotyp der *mdoB* Mutante konnte dann beobachtet werden, wenn die *mdoB* Mutation in einem *dgk* Stamm vorliegt und die Zellen in Medium mit Arbutinzusatz gezüchtet werden. Unter diesen Bedingungen ist die Wachstumsgeschwindigkeit der *dgk* Mutante RZ60 im Vergleich zum arbutinfreien Medium deutlich reduziert. Die Einführung der *mdoB*::Tn*10* Mutation in die *dgk* Mutante (WF60) stellt die ursprüng-

liche Wachstumsgeschwindigkeit, die ohne Arbutin vorhanden ist, wieder her. Dieser Effekt kann mit der unter diesen Bedingungen gemessenen Diglycerid-Akkumulation in Verbindung gebracht werden. Die bei der *dgk* Mutante RZ60 mit Arbutin gemessenen hohen Diglycerid-Werte werden durch die Einführung der *mdoB*::Tn*10* Mutation deutlich reduziert.

4. Diskussion

4.1. *mdoA* Phänotyp und chemotaxispositive Revertanten

Auf Grund der in dieser Arbeit ermittelten Daten können die in Abb. 11 (S. 95) schematisch dargestellten Wechselwirkungen als Hypothese postuliert werden.

Diese Darstellung basiert auf der Vorraussetzung, daß die bei *mdoA* Mutanten beobachteten phänotypischen Eigenschaften auf die *mdoA* Mutation zurückzuführen sind. Als Beweis hierfür können folgende Tatsachen angesehen werden: Die von H. Rotering unabhängig mit Hilfe der erhöhten Bacitracinresistenz isolierten *mdoA* Mutanten (H. Rotering, Persönliche Mitteilung) zeigen exakt denselben Phänotyp wie die in dieser Arbeit verwendeten *mdoA* Mutanten. In beiden Fällen ist es außerdem möglich, durch Selektion auf Wiederherstellung der Chemotaxis *mdoA*$^+$ Revertanten zu isolieren, die mit *pyrC* cotransduzierbar sind und wieder alle Eigenschaften des Wildtyps haben.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die *mdoA* Mutation die Ursache des beobachteten Phänotyps sein muß. Da noch nicht bekannt ist, ob es sich bei der *mdoA* Mutation um eine Mutation des Strukturgens oder eines Regulatorgens der membrangebundenen Komponente des Glucosyltransferase-Systems handelt (94), kann der beobachtete Phänotyp entweder direkt auf das Fehlen einer Komponente der MDO-Biosynthese oder auf eine Mutation in einem übergeordneten Regulationsgen zurückgeführt werden, das sowohl die Synthese von MDO als auch die Ausprägung der beobachteten Eigenschaften steuert.

Neben den oben erwähnten chemotaxispositiven *mdoA*$^+$ Revertanten traten auch chemotaxispositve Suppressormutanten auf, deren Fähigkeit zur Chemotaxis nicht mit

pyrC cotransduzierbar ist. Sie lassen sich auf Grund der zusätzlich auftretenden Eigenschaften in 2 Gruppen unterteilen:

1) χ-sensitive, denen das OmpC-Protein fehlt
2) χ-resistente mit der Porinausstattung der *mdoA* Mutante

Die mit den Suppressormutanten des 1. Typs durchgeführten Transduktionsexperimente weisen trotz der unerwartet niedrigen Kopplung zwischen *aroB*$^+$ *malA*$^+$ und OmpC$^-$-Phänotyp darauf hin, daß die für den OmpC$^-$-Verlust der Suppressormutanten verantwortliche Mutation in der *ompB* Genregion kartiert.

Dieselbe Suppressormutation kann auch zur Wiederherstellung der Chemotaxis führen, da es in einem Fall gelungen ist, diese Eigenschaft aus der Suppressormutante TA1008/1 in die *mdoA* Mutante TA2847 zu transduzieren. Es entstanden 3 Typen von OmpC$^-$ Transduktanten: solche mit hohem OmpF-Gehalt, solche mit niedrigem OmpF-Gehalt und solche, denen OmpF völlig fehlt, stattdessen aber ein neues Membranhauptprotein auftritt, bei dem es sich auf Grund seiner zwischen den Porinen und dem Flagellin liegenden Größe um LamB handeln könnte. Nur im Falle der Transduktante, deren OmpF-Gehalt hoch war, konnte die Ausbildung von Schwärmringen beobachtet werden.

An dieser Stelle ist die Beobachtung von Mizuno und Mizushima zu erwähnen, daß *envZ* Deletionsmutanten wenig OmpF und noch weniger OmpC synthetisieren (56). Da auf den in dieser Arbeit abgebildeten SDS-Polyacrylamidgelen kein OmpC-Protein zu erkennen ist, gleicht der Phänotyp der *envZ* Deletionsmutanten dem der oben erwähnten Transduktanten.

Wenn die Suppressormutation in der *mdoA* Mutante zur Wiederherstellung der Chemotaxis führt, so müßte die Einführung der Wildtyp *ompB* Genregion in die Suppressormutante TA1008/1 zum Verlust der Chemotaxis führen. Tatsächlich entstanden bei einer solchen Transduktion Kolonien, die unmittelbar nach der Isolierung den

chemotaxisnegativen Phänotyp der *mdoA* Mutante aufwiesen. Nach mehrmaligem Ausplattieren konnten die Zellen jedoch wieder normale Schwärmringe ausbilden.

Folgende Beobachtungen, die während der oben beschriebenen Experimente gemacht wurden, weisen darauf hin, daß die *ompB* Genregion instabil ist: Bei der Transduktion der Suppressormutation in die *mdoA* Mutante und den Wildtypstamm AB2847 trat eine Aufspaltung des Porinphänotyps ein. Außerdem beträgt die Kopplung zwischen *aroB*$^+$ *malA*$^+$ und dem OmpC$^-$-Phänotyp nur 50 bzw. 67%. Bei der anderen Transduktion, die der Einführung der Wildtyp *ompB* Genregion in die Suppressormutante diente, war der Chemotaxis- und Porinphänotyp der Transduktanten instabil.

Insgesamt weisen die Transduktionsergebnisse darauf hin, daß die Suppressormutation des 1. Typs, die die Fähigkeit zur Chemotaxis wiederherstellt und zum Verlust des OmpC-Proteins führt, im *ompB* Genbereich kartiert.

Danach kann angenommen werden, daß Wechselwirkungen zwischen der *ompB* Genregion und der Flagellensynthese bzw. dem Chemotaxissystem bestehen (Abb 11; S. 95).

In der Literatur ist bisher folgendes über einen solchen Zusammenhang bekannt: Stock et al. fanden 1985 (83), daß das gesamte CheY-Protein (65, 15, 47) und die N-terminale regulatorische Domäne des CheB-Proteins (31, 40, 79, 85) von *Salmonella typhimurium* zum N-Terminus der Proteine OmpR (98, 99) und Dye (21) aus *E. coli* und zum SpOA-Protein (22, 46) aus *Bacillus subtilis* homolog sind. Die Autoren nehmen daher an, daß das Chemotaxissystem in Bezug auf seine Funktion und Evolution mit Systemen verwandt ist, die die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen regulieren.

Sawai et al. beschrieben 1987 (73), daß die Zugabe des abstoßend wirkenden Salicylats (Repellent) zum Kulturmedium bei *E. coli* die OmpF-Synthese stark und die OmpC-Synthese schwach reprimmiert. Die volle Ausprägung dieses Effekts scheint zudem *ompB* abhängig zu sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß das Phänomen der Osmotaxis (90, 52) auch bei *E. coli* existiert, d.h. hohe Osmolarität abstoßend wirkt.

Darüber hinaus berichteten Gibson et al. 1987 (27), daß sowohl das *ompR* als auch das *envZ* Genprodukt bei *Salmonella typhimurium* für die normale Expression der unter anaeroben Bedingungen induzierten Tripeptid-Permease benötigt werden. Desweiteren ist bekannt, daß bestimmte *envZ* Mutationen (*envZ11*/*envZ473*) nicht nur die OmpF-Synthese, sondern auch die LamB und PhoA-Synthese beeinflussen (96, 95, 32). Insgesamt können diese Literaturdaten dahingehend interpretiert werden, daß die Funktion des *ompB* Operons nicht auf die Porinregulation beschränkt ist.

Der bei den Suppressormutanten des 2. Typs auftretende Phänotyp, d.h. χ-Resistenz trotz aktiver Chemotaxis ist in der Literatur für Revertanten des *flaK* Gens beschrieben (45). Bei diesen Revertanten ist das Hakenprotein der Flagelle strukturell verändert. Daß dies auch bei den hier vorliegenden Suppressormutanten der Fall sein könnte, wird dadurch unterstützt, daß das *flaK* Gen in der *flaI* Genregion nahe *pyrC* kartiert, und die in dieser Arbeit bestimmte Cotransduktionsrate zwischen χ-Sensitivität und *pyrC* bei 29% liegt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse, die mit den Suppressormutanten des 2. Typs erzielt wurden, muß jedoch berücksichtigt werden, daß dieser Suppressormutantentyp nur von der *mdoA* Mutante TA1009 isoliert werden konnte, die von einem Tn*10* Transposon in unmittelbarer Nähe des *mdoA* Gens kuriert worden war. Aus diesem Grund könnten genetische Veränderungen (z.B. Deletionen) eingetreten sein, die die Ausprägung des über die *ompB* Genregion bestimmten OmpC$^-$-Phänotyps verhindern. Diese Annahme wird durch das Auftreten von OmpC$^-$-Suppressormutanten nach der erneuten Einführung der *pyrC* Genregion aus der *mdoA* Mutante TA1008 unterstützt. Man könnte da-

her spekulieren, daß die Suppression des chemotaxisnegativen Phänotyps der *mdoA* Mutante üblicherweise über den *ompB* Genbereich stattfindet und speziell im Falle der *mdoA* Mutante TA1009 erst nach Einführung der *pyrC* Genregion aus der Mutante TA1008 manifest wird.

Die Tatsache, daß den Suppressormutanten des 1. Typs das OmpC-Protein fehlt, wirft die Frage auf, ob das Fehlen dieses Proteins allein die Ursache der Suppression sein kann. Dies scheint nicht der Fall zu sein, da weder die Einführung der *ompC* Mutation noch der *ompR2* Mutation (59) in die *mdoA* Mutante den chemotaxispositiven Phänotyp wiederherstellt. Es müßte sich demnach bei der Suppressormutation um eine nicht mit der *ompR2* Mutation identische Mutation im *ompB* Genbereich handeln, die ebenfalls zur Ausprägung eines OmpC$^-$-Phänotyps führt.

Als Hinweis für Wechselwirkungen zwischen dem *mdoA* Gen und dem *ompB* Operon kann auch der bei *mdoA* Mutanten beobachtete Porinphänotyp angesehen werden. (Abb. 11). In der äußeren Membran der *mdoA* Mutanten findet sich bei niedriger und hoher Osmolarität mehr OmpC und weniger OmpF als beim jeweiligen Wildtyp. Dies spricht dafür, daß eine veränderte Porinregulation vorliegt. Ob der Einfluß der *mdoA* Mutation auf die Porinregulation auf Transcriptionsebene, Translationsebene oder auf der Ebene des Membraneinbaus erfolgt, müßte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Der Effekt, den diese Verschiebung der Porinregulation für die Zelle hat, könnte darin zu sehen sein, daß die Durchlässigkeit der äußeren Membran herabgesetzt wird. Nikaido und Rosenberg konnten zeigen, daß die OmpF-Pore mit 0,58 nm einen geringfügig größeren Porenradius hat als die OmpC-Pore mit 0,54 nm (62) und die Diffusion über OmpF effektiver abläuft (61). Als Erklärungsmöglichkeit für diese geringere Durchlässigkeit kann neben dem zugunsten von OmpC verschobenen Porin-Gehalt auch

die Schleimbildung der *mdoA* Mutanten angesehen werden. Ingesamt könnte die Verringerung der Durchlässigkeit der äußeren Membran als Kompensationsmechanismus zum Ausgleich des MDO-Verlustes interpretiert werden.

Das Schwärmvermögen der *mdoA* Mutanten auf Trypton-Schwärmplatten scheint dem von *che* Mutanten (4, 5) zu entsprechen. In beiden Fällen bilden die Mutanten eine diffuse Schwärmzone um die Inokulationsstelle, wobei die Ausbildung der typischen Chemotaxisringe unterbleibt. Im Falle der *che* Mutanten liegt dies daran, daß die Signalübermittlung von den MCP`s zur Flagelle defekt ist, oder die Methylierung bzw. Demethylierung der MCP`s, d.h. die Adaptation an einen Reiz nicht mehr möglich ist. Diese Defekte äußern sich in einer für jede Mutante spezifischen Änderung des Rotationsverhaltens der Flagelle (80, 64, 17). *Che* Mutanten sind jedoch sensitiv gegenüber χ-Phagen (4). Es stellen sich daher in Bezug auf den Chemotaxisdefekt der *mdoA* Mutanten folgende Fragen:

- Ist die reduzierte Flagellenzahl die Ursache für den Chemotaxisdefekt?
- Wie kommt die Reduktion der Flagellen zustande?

Zur Klärung dieser Fragestellungen sollen in der Literatur beschriebene Mutationen betrachtet werden, die wie die *mdoA* Mutation die Flagellengene nicht direkt betreffen, aber zu einer Reduktion der Flagellenzahl führen.

Als erstes sind *galU* Mutanten zu nennen, die auf Grund eines Defekts der Glucose-I-Phosphat-Uridyltransferase keine UDP-Glucose synthetisieren können und daher rauhes LPS besitzen (25, 26, 87, 69). Sie haben weniger Flagellen und weniger flagellinspezifische m-RNA. Ihr Chemotaxisphänotyp gleicht dem von *mdoA* Mutanten. Die chemotaktische Signalübermittlung soll jedoch bei diesen Mutanten intakt sein (44). Komeda nimmt daher an, daß die Flagellenbasalkörper bei *galU* Mutanten auf Grund der Veränderungen der Zellhülle nur lose gebunden sind.

Diese lose Bindung soll Auswirkungen auf den Zusammenbau der Flagellen haben und möglicherweise die Flagellinsynthese hemmen (44).

Eine ähnliche Beobachtung hatten zuvor schon Ames et al. (3) gemacht, die feststellten, daß tiefrauhe LPS-Mutanten von *Salmonella typhimurium* kein Flagellin besitzen. Auch in diesem Fall wurde dies mit der Veränderung der äußeren Membran in Verbindung gebracht.

Auch *mdoA* Mutanten weisen Veränderungen der Zellhülle auf. Dies wird durch die Beobachtung von J. Höltje unterstützt, daß der Abstand zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran bei *mdoA* Mutanten unter milden Plasmolysebedingungen größer ist als beim Wildtyp und zudem keine oder nur sehr wenige Adhäsionsstellen zwischen äußerer Membran und Cytoplasmamembran sichtbar sind (J. Höltje, persönliche Mitteilung). Es ist jedoch auch zu beachten, daß *galU* Mutanten auf Grund ihres Enzymdefekts kein MDO synthetisieren können, und die Zellhülle tiefrauher LPS-Mutanten für Proteine durchlässig ist (3). Das Fehlen von MDO könnte daher auch bei diesen Mutanten die Ursache des Flagellenverlustes sein.

MDO`s könnten demnach in Zusammenhang mit der Flagellensynthese stehen. Die mit den Suppressormutanten des 1. Typs ermittelten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der *ompB* Genbereich an der Wechselwirkung zwischen *mdoA* Gen und Flagellensynthese beteiligt ist (Abb. 11; S. 95).

Zu der Frage, ob bei den *mdoA* Mutanten ein Defekt der chemotaktischen Signalübermittlung vorliegt, läßt sich folgendes sagen: Komeda erklärt in seiner Arbeit, daß *galU* Mutanten im Kapillartest in der Lage seien, positiv chemotaktisch auf Serin und negativ chemotaktisch auf Leucin zu reagieren (44). Diese Feststellung wird jedoch nicht durch Daten belegt. Die über *mdoA* Mutanten vorhandenen Daten lassen keine Aussage darüber zu, ob die *mdoA* Mutation zu einem Defekt der chemotaktischen Signalübermittlung führt. Um dies abzuklären, wäre es nötig,

das Schwimmverhalten der Mutanten und die Rotation der noch vorhandenen Flagellen genauer zu untersuchen. Die oben erwähnte Angabe von Adler, daß *che* Mutanten χ-sensitiv sind (4), macht jedoch die Annahme, daß bei *mdoA* Mutanten ein gleichartiger Signalübermittlungsdefekt vorliegt eher unwahrscheinlich.

In Bezug auf die Schleimbildung und die Bacitracinempfindlichkeit der *mdoA* Mutanten und der Suppressormutanten lassen sich folgende Aussagen machen: Alle *mdoA* Mutanten schleimen und sind bacitracinresistenter als der Wildtyp. Schleimbildung führt jedoch nicht grundsätzlich zu einem chemotaxisnegativen Phänotyp und zu erhöhter Bacitracinresistenz, da die *lon* Mutante MA27-1 (70) normale Schwärmringe ausbildet und zudem bacitracinsensitiver als der Wildtyp ist.

Alle Suppressormutanten (Typ1 und 2) schleimen nicht mehr und sind bacitracinsensitiver als der Wildtyp. Hierfür sind zwei Erklärungsmöglichkeiten denkbar: Entweder beide Phänotypen haben keine Beziehung zur *ompB* Genregion, sondern nur zum Chemotaxis-System, oder aber Flagellensynthese, Bacitracinsensitivität und Schleimbildung stehen in Beziehung zur *ompB* Genregion, der OmpC$^-$-Phänotyp wird aber bei den Suppressormutanten des 2. Typs nicht sichtbar. Wie oben schon erwähnt wäre es denkbar, daß eine durch das Kurieren des *zcd*::Tn*10* Transposons eingetretene genetische Veränderung die Ausprägung des OmpC$^-$ Phänotyps supprimmiert. Hierfür spricht die Tatsache, daß nach Wiedereinführung der *pyrC* Genregion aus der nicht kurierten Mutante bei allen χ-sensitiven Transduktanten der OmpC$^-$-Phänotyp wieder auftritt.

Die ursprüngliche Annahme, daß die Bacitracinwirkung über die Hemmung der Regeneration des Undecaprenylphosphat-Carriers in direktem Zusammenhang zur MDO-Synthese steht, wird auf Grund der erhöhten Bacitracinsensitivität der Suppressormutanten, bei denen keine MDO-Synthese

stattfindet, zweifelhaft. Man könnte vielmehr annehmen, daß die Suppression des Chemotaxisdefekts die Durchlässigkeit der äußeren Membran für Bacitracin erhöht, während die äußere Membran der *mdoA* Mutante selbst weniger durchlässig für Bacitracin ist. Dies wäre über den Porinphänotyp der *mdoA* Mutanten und der Suppressormutanten des 1. Typs erklärbar. Im Falle der *mdoA* Mutanten wird mehr von der kleineren, weniger durchlässigen OmpC-Pore (62, 61) synthetisiert, im Falle der Suppressormutanten des 1. Typs wird nur OmpF synthetisiert.

Die Empfindlichkeit der *mdoA* Mutanten ist gegenüber den Phagen λ und P1 reduziert. Im Zusammenhang damit ist die Beobachtung von J. Höltje interessant, daß *mdoA* Mutanten, die ein unter Temperaturkontrolle stehendes Expressionssystem des MS2-Lysisgens enthalten, nicht lysieren. Er konnte außerdem zeigen, daß das Lysisgenprodukt des Phagen nicht wie bei Wildtypzellen in der Membranfraktion zu finden ist (J. Höltje, persönliche Mitteilung).

Als Zusammenfassung der oben geführten Diskussion soll das in Abb. 11 dargestellte Modell als Hypothese vorgetellt werden:

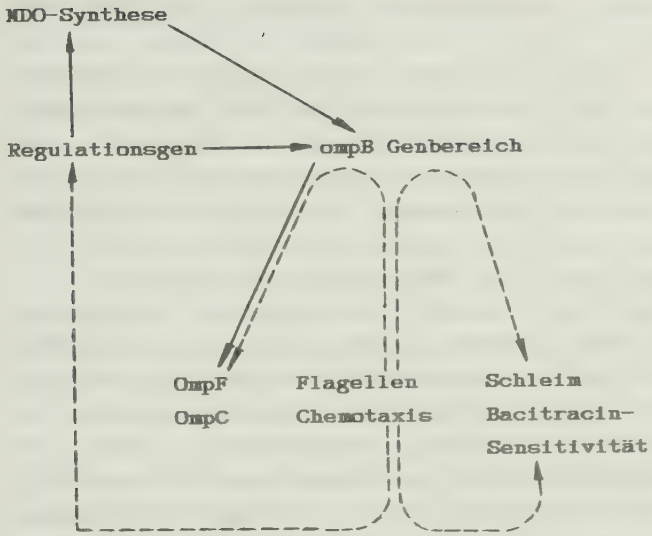


Abb. 11: Hypothetische Wechselwirkungen zwischen MDO-Synthese, Porinregulation und Chemotaxissystem

--- Wechselwirkungen, die vom Phänotyp der *mdoA* Mutante ableitbar sind.

- - Wechselwikungen, die auf Grund der Daten, die mit der Revertante und den Suppressormutanten ermittelt wurden, postuliert werden können.

Da die genetische Charakterisierung der *mdoA* Mutante unzureichend ist, muß offenbleiben, ob die MDO-Synthese direkt durch eine Mutation im Strukturgen der membrangebundenen Komponente des Glucosyl-Transferase-Systems (94) verhindert wird. Denkbar wäre auch eine Mutation in einem übergeordneten Regulationsgen, dessen Genprodukt

regulierend auf die MDO-Synthese und den *ompB* Genbereich einwirkt.

Die Tatsache, daß *galU* Mutanten wie *mdoA* Mutanten eine reduzierte Zahl von Flagellen haben (44), und *pgi* Mutanten (93) in Abwesenheit von Glucose (keine MDO-Synthese) bacitracinresistenter sind als in Anwesenheit von Glucose (H. Rotering, persönliche Mitteilung), ist Hinweis darauf, daß das Fehlen von MDO und nicht ein übergeordnetes Regulatorgen den *mdoA* Phänotyp hervorruft.

Als Hinweis für Wechselwirkungen zwischen MDO-Synthese und *ompB* Genbereich kann die Tatsache angesehen werden, daß neben *mdoA*$^+$ Revertanten von beiden *mdoA* Mutanten (TA1008 und TA1009) chemotaxispositive Suppressormutanten mit verändertem Porinphänotyp isoliert wurden, die im *ompB* Genbereich kartieren. Desweiteren kann der Porinphänotyp der *mdoA* Mutanten als Hinweis für Wechselwirkungen zwischen MDO-Synthese und der Porinregulation gewertet werden.

ompR Mutationen scheinen dagegen keinen Einfluß auf die MDO-Synthese zu haben. Die Einführung der *ompR1* (OmpF$^-$ OmpC$^-$), *ompR2* (OmpC$^-$), *ompR3* (OmpF$^-$) und *ompR4* (erhöhter OmpC-Gehalt bei niedriger Osmolarität, bei hoher Osmolarität unverändert) Mutationen (59) in den Wildtypstamm MA1008 hat keine deutliche Auswirkung auf den MDO-Gehalt der Zellen. Genaue quantitative Bestimmungen des MDO-Gehalts der verschiedenen *ompR* und *envZ* Mutanten müßten jedoch noch durchgeführt werden. Auswirkungen auf das Chemotaxisverhalten konnten bei der *ompR2*, *ompR3* und *ompR4* Mutation nicht festgestellt werden. Bei der *ompR1* Mutation konnte diese Frage auf Grund des schlechten Wachstums nicht beantwortet werden.

Ob der Schleim- und Bacitracin-Phänotyp der *mdoA* Mutanten und der Suppressormutanten mit dem *ompB* Genbereich in Zusammenhang steht, oder ob nur ein Zusammenhang mit dem Chemotaxissystem besteht, kann mit Hilfe der vorhandenen Daten nicht entschieden werden.

Zur Bestätigung des oben dargestellten Modells wären weitere Versuche zu folgenden Problemen notwendig: Um festzustellen, ob der Ausfall der MDO-Synthese oder ein übergeordnetes Regulaturgen den *mdoA* Phänotyp hervorruft, müßten solche Mutanten hinsichtlich ihres Phänotyps genauer untersucht werden, die kein MDO produzieren, aber *mdoA*$^+$ sind. Hierfür eigneten sich *galU* oder *pgi* Mutanten.

Die Frage, ob der Einfluß der *mdoA* Mutation auf die Porin- und Flagellensynthese auf Transcriptionsebene stattfindet, wäre durch Untersuchungen an Mud1(Ap,*lac*)-Mutanten der Porin- und Flagellengene zu klären.

Die Kartierung der Suppressormutation im *ompB* Genbereich müßte durch genauere Kartierungsexperimente mit klonierter DNA aus diesem Bereich bestätigt werden.

Um Aufschluß über den Suppressionsmechanismus zu erhalten, wäre es interessant die Frage abzuklären, ob die Veränderung der Porinexpression in den *mdoA* Mutanten und den Suppressormutanten tatsächlich eine Durchlässigkeitsänderung der äußeren Membran zur Folge hat.

4.2. Nachweis der *mdoB* Mutation und *mdoB* Phänotyp

Die hier näher charakterisierte Tn*10* Insertionsmutante war wie in Ref. 23, 72 beschrieben als 2-^{3}H-Glycerineinbau-Mutante selektioniert worden.
Von ihr war zunächst nur bekannt, daß sie MDO ohne Glycerinphosphat-Substituenten enthält. Auf welchem Enzymdefekt dieser Glycerinphosphatverlust beruht, war noch nicht nachgewiesen. Der Nachweis konnte in dieser Arbeit folgendermaßen geführt werden:

An der Übertragung des Glycerinphosphats auf MDO sind wie in der Einleitung schon dargestellt 2 Transfer-Enzyme beteiligt. Die membrangebundene Phosphoglycerin-Transferase I (37, 10), die ausschließlich Phosphatidylglycerin als Glycerinphosphat-Donor benutzt, und die periplasmatische Phosphoglycerin-Transferase II (29), die MDO als Glycerinphosphat-Donor benötigt.

Bei Ausfall der Phosphoglycerin-Transferase I wäre zu erwarten, daß das aus dieser Mutante isolierte MDO noch die Glycerinphosphat-Substituenten enthält, die von der Phosphoglycerin-Transferase I übertragen wurden (maximal 1 Glycerinphosphatsubstituent pro MDO-Molekül). Im MDO der Mutante konnte jedoch keinerlei 2-^{3}H-Glycerin-Markierung nachgewiesen werden. Die biochemische Glycerinbestimmung zeigte außerdem, daß der Glyceringehalt des Mutanten-MDO um den Faktor 30 geringer ist als der des Wildtyp-MDO. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde angenommen, daß die Tn*10* Insertionsmutation die Phosphoglycerin-Transferase I betrifft.

Um diese Annahme zu beweisen, wurde ein *in vivo* Test der Phosphoglycerin-Transferase I mit ganzen Zellen durchgeführt, bei dem Arbutin als künstlicher Phosphoglycerin-Akzeptor eingesetzt wurde. Die Testbedingungen wurden durch die Verwendung einer *pgi* und einer *mdoA* Mutante (93, 9, 94) so gestaltet, daß in den Zellen kein MDO als Glycerin-Phosphat-Donor vorhanden war. Damit wurde gewährleistet, daß die im Test gemessene Glycerin-

phosphat-übertragung ausschließlich auf die Phosphoglycerin-Transferase I zurüchzuführen ist.

Die Testergebnisse zeigen eindeutig, daß im Kulturüberstand der Mutante kein Arbutin-Phosphoglycerin nachweisbar ist. Dies kann mit dem Verlust der Phosphoglycerin-Transferase I erklärt werden. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Phosphoglycerinübertragung zwar erfolgt, die Glycerinphosphat-Substituenten aber wieder abgespalten werden. Daher sollte die mit dem Glycerinphosphat-Transfer verbundene Spaltung des Phosphatidylglycerins an Hand des dabei entstehenden Diglycerids in Wildtyp und Mutante verglichen werden.

Die Diglycerid-Messungen belegen, daß in der untersuchten Mutante ein Defekt der Phosphoglycerin-Transferase I vorliegt, da der Diglycerid-Gehalt des *dgk* Stammes RZ60 durch die Einführung der Tn*10* Insertion deutlich reduziert wird. Die Mutante WF 21-1 wird daher analog zu der von Kennedy gewählten Bezeichnung als *mdoB* Mutante (38) klassifiziert.

Die Tatsache, daß die durch die Einführung der Tn*10* Insertion erreichte Reduktion des Diglycerid-Gehalts weniger stark ist als die durch Anzucht bei hoher Osmolarität erreichte Reduktion, weist auf eine weitere auch bei der *mdoB* Mutante ablaufende, Diglycerid liefernde Reaktion hin. Die auch in der *mdoB* Mutante nachweisbare Reduktion des Diglycerid-Gehalts bei Anzucht in hochosmolarem Medium zeigt außerdem, daß es sich um eine osmotisch regulierte Reaktion handelt. Dieses Ergebnis könnte mit dem erhöhten Phosphoethanolamingehalt des Mutanten-MDO in Zusammenhang stehen. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, daß Miller und Kennedy (55) vor kurzem nachweisen konnten, daß von außen zu ganzen Zellen zugegebenes Phosphatidylethanolamin auch von *mdoB* Stämmen als Phosphoethanolamin-Donor für MDO genutzt wird. Die Autoren kommen daher zu dem Schluß, daß die Phosphoethanolamin-übertragung auf MDO durch ein anderes Enzym katalysiert wird als die Glycerin-Phos-

phat-übertragung.

Die bei *dgk mdoB* Doppelmutanten im Gegensatz zu *dgk* Mutanten vorhandene Arbutinresistenz, die auf den reduzierten Diglycerid-Gehalt der Doppelmutante zurückgeführt werden kann, kann zur Selektion von *mdoB* Mutanten genutzt werden. Jackson, Bohin und Kennedy haben auf diesem Weg ebenfalls eine Mutante isoliert, der die Phosphoglycerin-Transferase I fehlt und diese als *mdoB* Mutante bezeichnet (38).

Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse der Kartierung der Tn*10* Insertion zeigen, daß das Tn*10* in unmittelbarer Nähe des *tsr* Gens inseriert ist. Die Insertion des Tn10`s im *tsr* Gen kann jedoch ausgeschlossen werden, da die *mdoB*::Tn*10* Mutante auf Trypton-Schwärmplatten den der Serin-Chemotaxis zugeordneten Schwärmring ausbildet. Die hier ermittelte Kartierung der *mdoB*::Tn*10* Insertion stimmt mit der von Jackson, Bohin und Kennedy ermittelten Genreihenfolge *mdoB, serB, thr* (im Uhrzeigersinn) überein (38).

Dieses Kartierungsergebnis kann als weiterer Beweis für die Integration des Tn*10*`s im *mdoB* Gen gewertet werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Tn*10* nicht das *mdoB* Struktur-Gen, sondern einen positiven Regulator inaktiviert oder einen polaren Effekt auf das *mdoB* Gen ausübt..

Die Substituenten-Analyse des Mutanten-MDO zeigt, daß der Verlust der negativen Ladungen des Glycerinphosphats nicht durch den vermehrten Einbau von Succinat-Substituenten ausgeglichen wird. Die vermehrte Zahl der Phosphoethanolamin-Substituenten trägt nicht zur Bilanz der negativen Ladungen bei. Auf Grund dieser Messungen müßte daher angenommen werden, daß der *mdoB* Mutante tatsächlich negative Ladungen fehlen. Denkbar wäre jedoch auch, daß der Ladungsverlust durch andere nicht bekannte MDO-Substituenten ausgeglichen wird. In diese Richtung weist ein vor kurzem von H. Rotering ermitteltes Ergebnis: Eine Auftrennung von Wildtyp und Mutanten-MDO durch

HPLC-Ionenaustausch-Chromatographie ergab nur geringe Unterschiede im Elutionsprofil (H. Rotering, persönliche Mitteilung). Hätte das Mutanten-MDO den größten Teil seiner negativen Ladungen verloren, so wären größere Unterschiede im Elutionsverhalten zu erwarten.

Dieses Ergebnis scheint mit dem Fehlen eines *mdoB* spezifischen Phänotyps in Einklang zu stehen. Geht man von der von Kennedy geäußerten Annahme aus, daß die negativen Ladungen eine wichtige Funktion haben (43, 54), so sollte ihr Fehlen auch Auswirkungen haben.

Wenn der Verlust negativer Ladungen von der *mdoB* Mutante ganz oder teilweise kompensiert wird, ist es nicht mehr möglich, mit Hilfe eines Phänotyp-Vergleichs zwischen *mdoA* und *mdoB* Mutanten Aussagen über die Funktion der negativen MDO-Ladungen zu machen. Es kann lediglich spekuliert werden, daß der Verlust des Glycerinphosphats deshalb ausgeglichen wird, weil die negativen Ladungen für die Funktion von MDO nötig sind.

4.3. Grundsätzliche Überlegungen zur Funktion von MDO

Die Funktion der MDO`s kann auf der Grundlage der bisher bekannten Literaturdaten folgendermaßen beschrieben werden: Martinac et al. (52) konnten zeigen, daß ein durch Druck aktivierbarer, spannungsabhängiger (Membranpotential) Ionenkanal in der Zellhülle von *E. coli* existiert. Die Autoren postulieren, daß es sich bei diesem Kanal um einen Osmosensor handelt. Der Kanal weist einige Eigenschaften auf, die denen von Porinen, insbesondere dem NmpC und dem PhoE-Porin entsprechen. Daher nehmen die Autoren an, daß sich der Kanal in der äußeren Membran befindet und ein Porin darstellt. Der Zusammenhang zwischen den MDO`s und diesem hypothetischen Osmosensor könnte darin bestehen, daß MDO`s über die Aufrechterhaltung des sogenannten Donnan Potentials (84, 43) die Aktivierung (öffnung) des oben beschriebenen Ionenkanals beeinflussen. MDO`s hätten damit eine wichtige Funktion bei der Regulation der öffnung dieses Ionenkanals, d.h. bei Regulation der Durchlässigkeit der äußeren Membran in Abhängigkeit von der Osmolarität des umgebenden Mediums.

Im Zusammenhang mit der Anpassung der Zelle an äußere Reize wie niedrige bzw. hohe Osmolarität ist es interessant zu erwähnen, daß die Kopplung der MDO-Synthese mit dem Phospholipidstoffwechsel viele Parallelen aufweist zur Inositol-Phospholipidumsetzung von Eukaryonten, die eine wesentliche Rolle bei der zellulären Antwort auf extracelluläre Signale spielt (63).

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, daß der MDO-Verlust eine Reihe von Veränderungen der Zelle bedingt, die teilweise als Kompensationsmechanismen angesehen werden können und möglicherweise eine Änderung der Durchlässigkeit der äußeren Membran zur Folge haben (Porinverschiebung, Schleim). Weiterhin ergaben sich

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen MDO-Synthese, Porinregulation und Flagellensynthese. MDO könnte demnach in der Wechselwirkung mit dem *ompB* Genbereich an der Regulation der Durchlässigkeit der äußeren Membran beteiligt sein und damit gleichzeitig wichtige Eigenschaften der Zellen wie die Ausbildung von Flagellen und die Fähigkeit zur Chemotaxis beeinflussen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei mit *mdoA* und *mdoB* bezeichnete Mutanten der Biosynthese periplasmatischer Membranoligosaccharide (MDO) physiologisch charakterisiert.

mdoA1 Mutanten zeigen folgende phänotypische Eigenschaften: Verschiebung der Porinexpression, stark reduzierte Flagellenzahl, Verlust der Fähigkeit zur Chemotaxis, Schleimbildung, verringerte Sensitivität gegenüber Bacitracin. Die Tatsache, daß durch Selektion auf wiederhergestellte Chemotaxis eine *mdoA*$^+$ Revertante isoliert wurde, die wieder alle phänotypischen Eigenschaften des Wildtyps aufweist, belegt, daß die *mdoA1* Mutation die Ursache des oben beschriebenen Phänotyps ist.

Da die *mdoA1* Mutation genetisch noch ungenügend charakterisiert ist (94), kann der beobachtete Phänotyp entweder auf einen Defekt im Strukturgens des Glucosyltransferase-Systems der MDO-Synthese oder auf einen Defekt eines übergeordneten Regulatorgens zurückgeführt werden. Die Tatsache, daß *galU* Mutanten ebenfalls eine reduzierte Anzahl an Flagellen besitzen (44) und *pgi* Mutanten in Abwesenheit von Glucose (keine MDO-Synthese) bacitracinresistenter sind als in Anwesenheit von Glucose, ist Hinweis darauf, daß das Fehlen von MDO die Ursache des komplexen *mdoA* Phänotyps ist.

Der beobachtete Phänotyp zeigt, daß es Wechselwirkungen zwischen dem *mdoA* Gen und der Porinregulation sowie Wechselwirkungen zwischen *dem mdoA* Gen und der Flagellensynthese (dem Chemotaxis-System) gibt.

Das Fehlen des OmpC-Proteins bei den Suppressormutanten des 1. Typs und die Kartierung der hierfür verantwortlichen Mutation in der *ompB* Genregion, weisen darauf hin, daß der *ompB* Genbereich an der Wechselwirkung des *mdoA* Gens mit der Flagellensynthese (dem Chemotaxis-System) beteiligt ist.

Die durch 2-^{3}H-Glycerineinbauversuche isolierte Tn*10* Insertionsmutante WF21-1 wurde in unmittelbarer Nähe des *tsr* Gens bei 99,2 Min. kartiert. Mit Hilfe eines *in vivo* Tests der Phosphoglycerintransferase I konnte gezeigt werden, daß es sich bei dieser Tn*10* Insertionsmutante um eine *mdoB* Mutante handelt. Dieses Ergebnis wird durch Diglycerid-Bestimmungen, die auf eine reduzierte Phosphatidylglycerin-Spaltung in der *mdoB* Mutante hinweisen, unterstützt.

Quantitative Bestimmungen der MDO-Substituenten ergaben, daß das Mutanten-MDO kein Glycerin, aber genausoviel Succinat und etwa doppelt sowiel Phosphoethanolamin enthält wie Wildtyp-MDO. Obwohl der *mdoB* Mutante demnach der größte Teil der negativen MDO-Ladungen fehlen sollte, konnte kein Phänotyp beobachtet werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß der Ladungsverlust durch andere, bisher nicht bestimmte, negativ geladene Substituenten ausgeglichen wird. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, Aussagen über die Bedeutung der negativen Ladungen für die Funktion der MDO`s zu machen.

Literatur

1. Adler, J. (1966), Chemotaxis in bacteria, Science 153, 708-716

2. Adler, J. und Templeton, B. (1967), The effect of environmental conditions on the motility of *E. coli*, J. Gen. Microbiol. 46, 175-184

3. Ames, G. F-L., Spudich, E.N. und Nikaido, H. (1974) Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccaride mutations, J. Bacteriol. 117, 406-416

4. Armstrong, J.B., Adler, J. und Dahl, M.M. (1967) Nonchemotactic mutants of *E. coli*, J. Bacteriol. 93, 390-398

5. Armstrong, J.B. und Adler, J. (1969), Location of genes for motility and chemotaxis on the *E. coli* genetic map, J. Bacteriol. 97, 156-161

6. Bachman B.J. (1983), Linkage map of *E. coli K-12*, Ed. 7, Microbiol. Rev. 47, 180-230

7. Bligh, E.G. und Dyer, J.J. (1959), A Rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-918

8. Bochner, B.R., Huang, H.-C., Schieven, G.L. und Ames, B.N. (1980), Positive selection for loss of tetracycline resistance, J. Bacteriol. 143, 926-933

9. Bohin, J-P. und Kennedy E.P. (1984), Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *E. coli*, J. Bacteriol. 157, 956-957

10. Bohin, J-P. und Kennedy E.P. (1984), Regulation of the synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *E. coli*: Assay of phosphoglycerol transferase I *in vivo*, J. Biol. Chem. 259, 8388-8393

11. Brass, J.M., Higgins C.F., Foley, M., Rugman P.A., Birmingham J. und Garland P.B. (1986), Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *E. coli*, J. Bacteriol. 165, 787-794

12. Braun, V. und Rehn, K. (1969), Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (mureinlipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure, Europ. J. Biochem. 10, 426-438

13. Braun, V. (1975), Covalent lipoprotein from the outer membrane of *E. coli*, Biochim. Biophys. Acta 415, 335-337

14. Braun, V., Fischer, E., Hantke, K., Heller, K. und Rotering, H., (1985) Functional aspects of gramnegative cell surfaces, Subcellular Biochemis Biochemistry Vol. 11 (Roodyn, D.B. ed.)

15. Clegg, D.O. und Koshland, D.E.Jr. (1984), The role of signaling protein in bacterial sensing: Behavioral aspects of increased gene expression, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 5056-5060

16. Datta, D.B., Arden, B. und Henning, U. (1977), Major proteins of *E. coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors, J. Bacteriol. 131, 821-829

17. De Franco, A.L., Parkinson, J.S. und Koshland, D.E.Jr. (1979), Functional homology of chemotaxis genes in *E. coli* and *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 139, 107-114

18. De Pamphilis, M.L. und Adler, J. (1971), Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *E. coli* and *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol. 105, 384-395

19. De Pamphilis, M.L. und Adler, J. (1971), Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane, J. Bacteriol. 105, 396-407

20. De Pamphilis, M.L. (1971), Dissociation and reassembly of *E. coli* outer membrane and of lipopolysaccharide, and their reassembly onto flagellar basal bodies, J. Bacteriol. 105, 1184-1199

21. Drury, L.S. und Buxton, R.S. (1985), DNA sequence analysis of the *dye* gene of *E. coli* reveals amino acid homology between the Dye and OmpR proteins, J. Biol. Chem. 260, 4236-4242

22. Ferrari, F.A., Trach, K., le Coq, D., Spence, J., Ferrari, E. und Hoch, J.A. (1985), Characterization of the *spo0A* locus and its deduced produkt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2647-2651

23. Fiedler W. (1983), Isolierung und Charakterisierung von *E. coli* Mutanten der Biosynthese von Makromolekülen, die mit 2-^{3}H-Glycerin markiert werden können, Diplomarbeit, Universität Tübingen

24. Fiedler, W. und Rotering, H. (1985), Characterization of an *E. coli mdoB* mutant strain unable to transfer *sn*-1-phosphoglycerol to membrane-derived oligosaccarides, J. Biol. Chem. 260, 4799-4806

25. Fukusawa, T., Jokura, K. und Kurahashi, K. (1962) A new enzymic defect of galaktose metabolism in *E. coli K12* mutants, Biochem. Biophys. Commun. 7, 121-125

26. Fukusawa, T., Jokura, K. und Kurahashi, K. (1963), Mutations in *E. coli* that affect urdine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity and galaktose fermentation, Biochim. Biophys. Acta 74, 608-620

27. Gibbson, M.M., Ellis, E.M., Graeme-Cook, K.A. und Higgins, C.F. (1987), OmpR and EnzZ are pleiotropic regulatory proteins: Positive regulation of the tripeptide permease (*tppB*) of *Salmonella typhimurium*, Mol. Gen. Genet. 207, 120-129

28. Glauner, B. (1986), Das Murein von *E. coli*: Untersuchungen der molekularen Feinstruktur unter Berücksichtigung der wachstumsbedingten Dynamik, Dissertation , Universität Tübingen

29. Goldberg, D.E., Rumley, M.K. und Kennedy, E.P. (1981), Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: A periplasmic phosphoglycerol transferase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5513-5517

30. Gotschlich, E.C., Fraser, B.A., Nishimura, O., Robbins, J.B. und Liu, T.Y. (1981), Lipid capsular polysaccharides of gramnegative bacbacteria, J. Biol. Chem. 256, 8915-8921

31. Goy, M.F., Springer, M.S. und Adler, J. (1977), Sensory transduction in *E. coli*: role of protein methylation reaction in sensory transduction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4964-4968

32. Hall, M.N. und Silhavy, T.J. (1981), Genetic analysis of the *ompB* Locus in *E. coli K12*, J. Mol. Biol. 151, 1-15

33. Hantke, K. (1973), Aufklärung einer neuen kovalenten Bindungsart zwischen Lipid und Protein am Murein-Lipoprotein von *E. coli*, Dissertation, Universität Tübingen

34. Hantke, K. (1981), Regulation of ferric iron transport in *E. coli K12*: Isolation of a constitutive mutant, Mol. Gen. Genet. 182, 288-292

35. Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villinger, W. und Kellenberger, E. (1984), Periplasmic Gel: New concept resulting from reinvestigations of bacteria cell envelope ultrastructure by new methods, J. Bacteriol. 160, 143-152

36. Hoffmann, H. (1986), Proform und reifes FhuA-Rezeptorprotein von *E. coli K12*: Reindarstellung und biologische Eigenschaften, Dissertation, Universität Tübingen

37. Jackson, B. und Kennedy, E.P. (1983), The Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: A membrane-bound phosphoglycerol-transferase, J. Biol. Chem. 258, 2394-2398

38. Jackson, B., Bohin J-P. und Kennedy, E.P. (1984), Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: Charakterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity, J. Bacteriol. 160, 976-981

39. Kawaji, H., Mizuno, T. und Mizushima, S. (1979), Influence of molekular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *E. coli K12*, J. Bacteriol. 140, 843-847

40. Kehry, M.R., Bond, M.W., Hunkapiller, M.W. und Dahlquist, F.W. (1983), Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *E. coli* catalyzed by the *cheB* gene produkt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3599-3603

41. Kellenberger, E. und Ryter, A. (1958), Cell wall and cytoplasmic membrane of *E. coli*, J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 323-326

42. Kennedy, E.P., Rumley, M.K., Schulman, H. und van Golde, L.M.G. (1975), Identification of *sn*-glycero-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides of *E. coli*, J. Biol. Chem. 251, 4208-4213

43. Kennedy, E.P. (1981), Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1092-1095

44. Komeda, Y., Icho, T. und Iino, T. (1977), Effects of *galU* mutation on flagellar formation in *E. coli*, J. Bacteriol. 129, 908-915

45. Komeda, Y., Silverman, M. und Simon, M. (1978), Identification of the structural gene for the hook subunit protein of *E. coli* flagella, J. Bacteriol. 133, 364-371

46. Kudoh, J., Ikeuchi, T. und Kurahashi, K. (1985), Nucleotide sequences of the sporulation gene *spo0A and its mutant genes of Bacillus subtilis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2665-2668

47. Kuo, S.C. Daniel, E.und Koshland D.E.Jr. (1987), Roles of *cheY* and *cheZ* gene produkts in controlling flagellar rotation in bacterial chemotaxis of *E. coli*, J. Bacteriol. 169, 1307-1314

48. Laimins, L.A., Rhoads, D.B. und Epstein, W. (1981), Osmotic control of *kdp* operon expression in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 464-468

49. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P. und van Alphen, L. (1975), Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *E. coli K12* into four bands, FEBS Lett. 58, 254-258

50. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. und Berendsen, W. (1976), Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *E. coli*, Molec. Gen. Genet. 147, 251-262

51. Lundrigan, M.D. und Earhart, C.F. (1984), Gene *envY* of *E. coli K12* affects thermoregulation of major porin expression, J. Bacteriol. 157, 262-268

52. Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A.H., Adler, J. und Kung, C. (1987), Pressure sensitive ion channel in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 2297-2301

53. Miller, J.H. (ed.), (1972) Experiments in molekular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

54. Miller, K.J., Kennedy, E.P. und Reinhold, V.N. (1986), Osmotiv adaptation by gramnegative bacteria possible Role for periplasmic oligosaccharides, Science 231, 48-51

55. Miller, K. und Kennedy, E.P. (1987), Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the membrane-derived oligosaccharides of *E. coli*, J. Bacteriol. 169, 682-686

56. Mizuno, T. und Mizushima, S. (1987), Isolation and characterization of deletion mutants of *ompR* and *envZ* regulatory genes for expression of the outer membrane proteins OmpC and OmpF in *E. coli*, J. Biochem. 101, 387-396

57. Mizushima, S. und Yamada, H. (1975), Isolation and characterization of two outer membrane preparations from *E. coli*, Biochim. Biophys. Acta 375, 44-53

58. Munro, G.F. und Bell, C. (1973), Effects of external osmolarity on phospholipid metabolism in *E. coli B*, J. Bacteriol. 116, 257-262

59. Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T. und Mizushima, S. (1986), Molecular analysis of mutant *ompR* genes exhibiting different phenotypes as to osmoregulation of the *ompF* and *ompC* genes of *E. coli*, Molec. Gen. Genet. 202, 194-199

60. Nikaido, H. (1979), Non specific transport through the outer membrane, in: Bacterial Outer Membranes, (M. Inouye, ed.), John Wiley and Suns, New York p.p. 361-407

61. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y. und Foulds, J. (1983) Porin channels in *E. coli*: Studies with β-lactams in intact cells, J. Bacteriol. 153, 232-240

62. Nikaido, N. und Rosenberg, E.Y. (1983), Porin channels in *E. coli*: Studies with liposomes reconstitued from purified proteins, J. Bacteriol. 153, 241-252

63. Nishizuka, Y. (1984), The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion, Nature 308, 693-698

64. Parkinson, J.S. (1978), Complementation analysis and deletion mapping of *E. coli* mutants defective in chemotaxis, J. Bacteriol. 135, 45-53

65. Parkinson, J.S., Parker S.R., Talbert, P.B. und Houts, S.E. (1983), Interactions between chemotaxis genes and flagellar genes in *E. coli*, J. Bacteriol. 155, 265-274

66. Raetz, C.R.H. (1978), Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid-synthesis in *E. coli*, Microbiol. Rev. 42, 614-659

67. Raetz, C.R.H. und Newman K.F. (1978), Neutral lipid accumulation in the membranes of *E. coli* mutants lacking diglyceride kinase, J. Biol. Chem. 253, 3882-3887

68. Raetz, C.R.H. und Newman, K.F. (1979), Diglyceride kinase mutants of *E. coli*: inner membrane association of 1,2-diglyceride and its relation to synthesis of membrane-derived oligosaccharides J. Bacteriol. 137, 860-868

69. Risse, H.J., Lüderitz, O. und Westphal, O. (1967), Vergleichende Untersuchungen zur Biosynthese von Nucleotidzuckern in S- und R-Formen von *Salmonella minnesota* und *Salmonella ruiru*, Eur. J. Biochem. 1, 233-242

70. Rollinger, W. (1982), Untersuchungen zur Lipidsynthese des Lipoproteins von *E. coli*, Dissertation, Universität Tübingen

71. Rotering, H. und Raetz, C.R.H. (1983), Appearance of monoglyceride and triglyceride in the cell envelope of *E. coli* mutants defective in diglyceride kinase, J. Biol. Chem. 258, 8068-8073

72. Rotering, H., Fiedler, W. Rollinger, W. und Braun, V. (1984), Procedure for the identification of *E. coli* mutants affected in components containing glycerol derived from phospholipid turnover: isolation of mutants lacking glycerol in membrane-derived oligosaccharides (MDO), FEMS Lett. 22, 61-68

73. Sawai, T., Hirano, S. und Yamaguchi, A. (1987), Repression of porin synthesis by salicylate in *E. coli, Klebsiella pneumoniae* und *Serratia marcescens*, FEMS Lett. 40, 233-237

74. Schindler, H. und Rosenbusch J.P. (1978), Matrix protein from *E. coli* outer membrane forms voltage controlled channels in lipid bilayers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3751-3755

75. Schindler, H. und Rosenbusch, J.P. (1981), Matrix protein in planar membranes: Clusters of channels in a native environment and their funktional reassembly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 2302-2306

76. Schneider, J.E., Reinhold, V., Rumley, M.K. und Kennedy, E.P. (1979), Struktural studies of the membrane-derived oligsaccharides of *E. coli*, J. Biol. Chem. 254, 10135-10138

77. Schulman, H. und Kennedy, E.P. (1977), Relation of turnover of membrane phospholipids to synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *E. coli*, J. Biol. Chem. 252, 4250-4255

78. Schulman, H. und Kennedy, E.P. (1979), Localization of membrane-derived oligosaccharides in the outer envelope of *E. coli* and their occurance in other gramnegative bacteria, J. Bacteriol. 137, 686-688

79. Sherris, D. und Parkinson, J.S. (1981), Posttranslational processing of methyl-accepting chemotaxis proteins in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6051-6055

80. Silverman, M. und Simon, M. (1977), Identification of polypeptides necessary for chemotaxis in *E. coli*, J. Bacteriol. 130, 1317-1325

81. Skurray, R.A., Hancock, R.E.W, und Reeves, P., (1974), Con$^-$ mutants, class of mutants in *E. coli K12* lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage, J. Bacteriol. 119, 726-735

82. Spiro, R.G. (1966), Analysis of sugars found in glycoproteins, Methods in Enzymology 8, 3-26

83. Stock, A., Koshland D.E.Jr. und Stock, J. (1985), Homologies between the *Salmonella typhimurium cheY* protein and proteins involved in regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7989-7993

84. Stock, J.B., Rauch, B. und Roseman, S. (1977), Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *E. coli*, J. Biol. Chem. 252, 7850-7861

85. Stock, J.B. und Koshland, D.E.Jr. (1978), A protein methylesterase involved in bacterial sensing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3659-3663

86. Stone, K.J. und Strominger, J.L. (1971), Mechanism of action of bacitracine: Complexation with metal ion and C_{55}-isoprenyl-pyrophosphate, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3223-3227

87. Sundarajan, T.A., Rapin, A.M.C. und Kalckar H.M. (1962), Biochemical observations on *E. coli* mutants defective in uridine diphosphoglucose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 2187-2193

88. Therisod, H. Weissborn, A.C. und Kennedy, E.P. (1986), An essential function for acyl-carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7236-7240

89. Thipayathasana, P. und Valentine, R.C. (1974), The requirement for energy transducing ATPase for anaerobic motility in *E. coli*, Biochim. Biophys. Acta 347, 464-468

90. Tso, W.W. und Adler, J. (1974), Negative chemotaxis in *E. coli*, J. Bacteriol. 118, 560-576

91. van Alphen, W. und Lugtenberg, B. (1977), Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *E. coli*, J. Bacteriol. 131, 623-630

92. van Golde, L.M.G., Schulman, H. und Kennedy, E.P. (1973), Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1368-1372

93. Vinopal, R.T., Hillman, J.P.,Schulman, H., Reznikoff, W.S. und Fraenkel, D.G. (1975), New phosphoglucose isomerase mutants of *E. coli*, J. Bacteriol. 122, 1172-1174

94. Weissborn, A.C. und Kennedy, E.P. (1984), Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: Novel glucosyltransferase system from *E. coli* for the elongation of β 1-2 linked polyglucose chains, J. Biol. Chem. 259, 12644-12651

95. Wandersman, C., Moreno, F. und Schwartz, M. (1980), Pleiotropic mutations rendering *E. coli K12* resistant to bacteriophage TP1, J. Bacteriol. 143, 1374-1383

96. Wanner, B.L., Sarthy, A. und Beckwith, J. (1979), *E. coli* pleiotropic mutant that reduces amounts of several periplasmic and outer membrane proteins, J. Bacteriol. 140, 229-239

97. Wu, T.T. (1966), A model for three-point analysis of random general transduction, Genetics 54, 405-410

98. Wurtzel, E.T., Chou, M.-Y. und Inouye, M. (1982), Osmoregulation of gene expression: 1. DNA-Sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *E. coli* and characterization of its gene product, J. Biol. Chem. 257, 13685-13691

99. Youl-Lae, J., Nara, F., Ichihara, S., Mizuno, T. und Mizushima, S. (1986), Purification and characterization of the OmpR protein, a positive regulator involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *E. coli*, J. Biol. Chem. 261, 15252-15256

Lebenslauf

Waltraud Anneliese Fiedler

18. Oktober 1957	geboren in Stuttgart
1964 - 1967	Grundschule in Stuttgart
1967 - 1976	Heidehofgymnasium in Stuttgart
14. Mai 1976	Abitur
ab SS 1977	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
7. Mai 1979	Diplomvorprüfung
5. August 1983	Diplomhauptprüfung in Biologie, Hauptfach Mikrobiologie; Diplomarbeit am Lehrstuhl II für Mikrobiologie, Universität Tübingen mit dem Titel: "Isolierung und Charakterisierung von *Escherichia Coli*-Mutanten der Biosynthese von Makromolekülen, die mit 2-^{3}H-Glycerin markiert werden können"
September 1983 bis September 1987	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl II für Mikrobiologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C. F. Bardele, F. W. Bentrup, W. Bessler,

H. Biessmann, V. Braun, D. Bunke, W. Engels, G. Forkmann,

W. Frey, K. G. Grell, J. Grunewald, J. Guglielmi,

K. P. Hadeler, A. Hager, K. Hannack, K. Hantke, W. Harder,

V. Hemleben, G. Jung, P. Lange, W. Loeffler,

C. Meier-Brook, F. Oberwinkler, K. Poralla, H. Probst,

W. Rähle, A. Rieker, H. Rotering, B. Schwemmle, W. Seiler,

H.U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich, H. Tichy, P. Wenk,

G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner